

***Lymnaea stagnalis*: ensaaios de toxicidade e técnicas experimentais de manuseamento.**

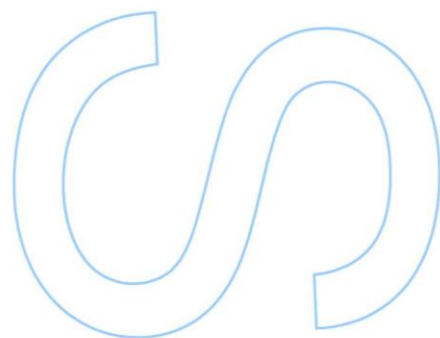
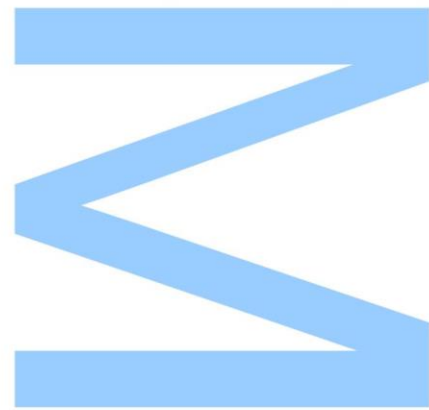
Joana Filipa Valério Anjos

Mestrado Biologia e Gestão da Qualidade da Água

Departamento de Biologia
2018

Orientadores

Professor Doutor Luis Filipe Pereira Oliva Teles, Professor Auxiliar,
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

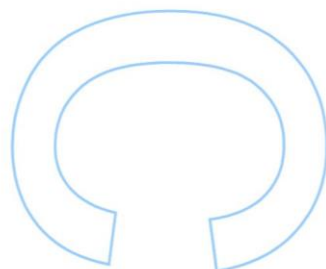
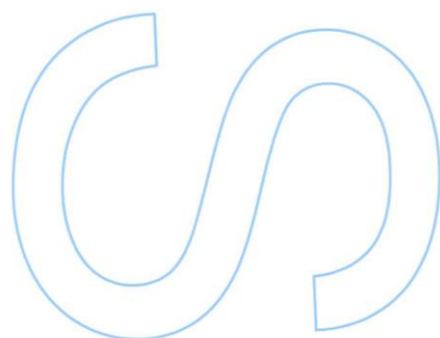
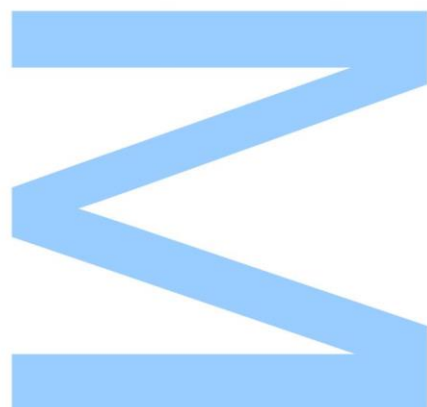




Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Ao amor da minha vida. O mundo é nosso.

“Eduquem as crianças e não será necessário castigar os homens.”

Pitágoras

Agradecimentos

A realização desta dissertação foi um processo demorado e que me fez passar por um misto de sentimentos, desde a sensação que não iria conseguir acabar, passando pelo medo de fazer o meu trabalho de forma errada, até às alegrias das pequenas vitórias conquistadas! Porém, nada disto seria possível sem a ajuda de algumas pessoas à minha volta que se mostraram sempre prontas a apoiar-me em todos os sentidos.

Assim, começo por agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Luis Filipe Oliva Teles, por ter aceite, em primeiro lugar, iniciar um projeto em específico para mim, adaptado às minhas necessidades. Agradeço ainda por todos os conselhos, dúvidas tiradas e conhecimentos que me ajudou a adquirir.

Um obrigado também ao Professor Doutor António Paulo de Carvalho, por toda a ajuda disposta na manutenção da cultura, nas dúvidas respondidas, no tempo disposto em ir comigo ao laboratório verificar se existia material para trabalhar e pela ajuda na preparação do meio para colocar na cultura.

Não posso deixar de oferecer o meu mais sincero obrigado à Professora Doutora Maria da Natividade Vieira por todas as soluções que encontrou para os meus problemas, por todo o apoio, por nunca ter desistido de me defender e por ser uma professora que realmente mostra preocupação e interesse nos alunos que acompanha. Sem a professora eu não teria começado logo esta dissertação e provavelmente teria perdido um ano letivo.

Agradeço à Bárbara Machado, à Mafalda Fonseca, à Celeste Cunha, à Sara Macedo e à Tatiana Garcia por todo o tempo passado comigo, a sofrer comigo, a ouvir-me desabafar de todos os aspetos negativos e a festejar os momentos positivos por que passei durante a execução desta tese. As amigas verdadeiras prevalecem para a vida, quer sejam desde sempre, quer sejam feitas de forma improvável.

Não posso deixar em branco todo o apoio e preocupação que a minha família depositou em mim ao longo deste tempo. Aos meus pais que permitiram que eu realizasse o meu curso, apoiando-me sempre em todos os momentos e de todas as maneiras, sem duvidar das minhas capacidades, demonstrando sempre orgulho e amor incondicional. Sem vocês toda a minha vida não era possível, devo-vos o meu esforço, amor, felicidade e futuro, devo-vos o mundo. À minha madrinha, aos meus avós e à minha tia São, por todo o carinho e interesse que mostraram não só no meu trabalho ao longo deste ano,

mas também durante o resto da minha vida académica. Acompanharam-me toda a vida e continuaram sempre a acompanhar, mesmo que seja no meu coração.

O meu maior obrigado vai para o Leandro Santos, meu namorado, pela sua determinação, ajuda, sugestões e correções. Ele esteve sempre presente para tudo, ajudou a elevar o meu estado de espírito mantendo-se sempre positivo, suportou todos os meus problemas, auxiliou-me durante as partes práticas da dissertação, fez-me sorrir, ouviu as minhas preocupações, ajudou-me com os meus medos, arranjou soluções para os problemas, passou os dias inteiros na faculdade comigo e nunca me deixou ir abaixo. Ajudou-me ainda a manter uma vida social, uma vez que arranjava sempre forma de me tirar da frente do computador para ir socializar ou simplesmente apanhar ar. Farás para sempre parte de tudo, da minha vida, de mim. Amo-te.

The author would like to thank the EU and FCT/UEFISCDI/FORMAS for funding, in the frame of the collaborative international Consortium REWATER financed under the ERA-NET Cofund WaterWorks2015 Call. This ERA-NET is an integral part of the 2016 Joint Activities developed by the Water Challenges for a Changing World Joint Programme Initiative (Water JPI).

Resumo

A água é um bem essencial para a sobrevivência, tanto do planeta Terra como das espécies que nele habitam. Assim, seria de esperar que, devido à sua grande importância, esta matéria prima seria mais bem conservada e protegida, contudo, conforme aumenta a população no mundo, verifica-se uma maior degradação do meio aquático. O Homem, cada vez mais, fabrica substâncias que têm um efeito potencialmente negativo nos habitats aquáticos e nas espécies que o habitam, o que tem vindo a tornar-se uma preocupação colossal a nível global. A necessidade de se compreender a forma como as diferentes substâncias afetam o meio aquático, torna-se então, um ponto fulcral para garantir a continuidade das espécies e do ecossistema aquático.

A melhor forma para se compreender o modo de ação dos diferentes químicos é recorrer a testes toxicológicos que, para além de nos ajudar a entender quais os efeitos do tóxico, também serve para determinar qual a concentração da substância tóxica e qual o tempo de exposição necessários para produzir efeitos críticos nos organismos. Para se efetuar testes de toxicidade, é necessário selecionar uma espécie que seja um bom modelo experimental, sendo que os organismos aquáticos têm sido amplamente utilizados neste sentido. *Lymnaea stagnalis* é um gastrópode aquático pulmonado que tem vindo a ser abundantemente empregue em diferentes investigações, devido à sua fácil manutenção e facilidade em ser utilizado durante todas as fases de desenvolvimento.

Nesta dissertação realizou-se um estudo que iniciou por elucidar quais os melhores métodos para lavar as massas de ovos colocadas pelos adultos de *L. stagnalis*, assim como qual a melhor forma de individualizar os ovos que se encontram protegidos pela matriz gelatinosa da massa de ovos. Concretizou-se, seguidamente, uma observação de todas as fases de desenvolvimento, para serem esclarecidos todos os eventos característicos de cada fase embrionária. Para além disso, realizaram-se pequenos ensaios para tentar obter uma melhor compreensão sobre qual a altura do dia e qual o local preferencial para a postura de massas de ovos, assim como para clarificar se a presença/ausência da massa de ovos interfere com o desenvolvimento dos embriões. À parte de todos estes ensaios, o grande objetivo do trabalho foi testar quais os efeitos que o ácido Heptadecafluorooctanesulfónico, o ácido Perfluoro-octanoico, o Tiaclopride, o Sertralina, o Imidacloprida, o Venlafaxina, o Formaldeído, o Bisfenol A, o Hipoclorito de Sódio e o Etanol provocam em *Lymnaea stagnalis*.

Os resultados obtidos informaram que: não é possível obter uma hora do dia e um local preferencial para a postura de massas de ovos; a técnica para lavar as massas utilizada não danifica em nenhuma forma os ovos que se encontram dentro da massa; o procedimento para individualizar os ovos é viável e adaptado às necessidades dos embriões; é possível que a presença da matriz gelatinosa possa efetivamente retardar o desenvolvimento embrionário, porém, esta condição não foi possível de validar, uma vez que pode ter ocorrido uma contaminação no ensaio, levando à morte dos embriões; existem quatro fases de desenvolvimento (Mórula, Trocófora, Velígera e Hippo), com eventos característicos e bem visíveis que permitem diferenciar cada uma delas.

Relativamente aos testes toxicológicos verificou-se que: os tóxicos Etanol, Hipoclorito de Sódio e Formaldeído são altamente tóxicos para *L. stagnalis*; o Tiaclopride não provoca mortalidades, mesmo quando aplicado na concentração máxima permitida pela OCDE (2014); o Imidacloprida apresenta resultados contrários aos dos restantes químicos, uma vez que provoca maior mortalidade na concentração mais baixa, em vez de ser nas concentrações mais altas; o valor de LC10, LC20 e LC50 48h de *Lymnaea stagnalis* para o Venlafaxina é 0,192 mg/L, 0,644 mg/L e 6,512 mg/L respetivamente; o valor de LC10, LC20 e LC50 48h de *Lymnaea stagnalis* para o Bisfenol A é 1,15 mg/L, 2,348 mg/L e 9,194 mg/L, respetivamente.

Assim, é possível concluir que o gastrópode da espécie *Lymnaea stagnalis* é um bom organismo para ser utilizado em testes toxicológicos, não só devido à facilidade de manutenção que este necessita, mas também porque: é possível individualizar os ovos e trabalhar com eles dessa forma; as suas fases de desenvolvimento são bem delineadas e fáceis de se estudar; os resultados obtidos durante os ensaios toxicológicos evidenciam que estes indivíduos são mais sensíveis a alguns tóxicos que a *Daphnia magna*, cujos valores de LC50 48h são bastante superiores aos calculados durante esta investigação.

Palavras-chave: Ácido Heptadecafluorooctanesulfónico, Ácido Perfluoro-octanoico, Bisfenol A, Sertralina, Venlafaxina, Imidacloprida, Tiaclopride, Hipoclorito de Sódio, Etanol, Formaldeído, Gastrópode aquático, Individualização de ovos.

Abstract

Water is an essential asset for the survival of both the Earth and the species that inhabit it. Therefore, one would expect that, due to its great importance, this source of life would be better preserved and protected. However, with the increase of the world's population, there is further degradation of the aquatic environment. Mankind manufactures more and more substances that have tremendous negative effects on aquatic habitats and its entire species, which has become a colossal global concern. The need to understand how the different substances affect the aquatic environment becomes a fundamental point to ensure the continuity of the species and the aquatic ecosystem.

The best way to understand the mode of action of different chemicals is to use toxicological tests that, in addition to helping us understand what the effects of the toxicant, also serve to determine the concentration of the toxic substance and the time of exposure needed to produce critical effects on organisms. In order to perform toxicity tests, it is necessary to select a species that is a good bioindicator, and aquatic organisms that have been widely used in this sense. *Lymnaea stagnalis* is a pulmonary aquatic gastropod that has been extensively applied in different researches due to its easy maintenance and easiness of use during all stages of development.

In this dissertation a study was carried out that began by elucidating the best methods to wash the egg masses placed by adults of *L. stagnalis*, as well as best way to individualize eggs that were protected by the gelatinous matrix of the egg mass. It was implemented an observation of all stages of development, in order to clear up all the characteristic events of each embryonic stage. In addition, there were small trials in order to gain a better understanding about the preferred time of day as well as the selected places for laying egg masses and for clarifying if the presence/absence of such masses interfere with the development of the embryos. Apart from all of these trials, the main purpose of this essay was to test the effects of Heptadecafluorooctanesulfonic acid, Perfluorooctanoic acid, Thiachloprid, Sertraline, Imidacloprid, Venlafaxine, Formaldehyde, Bisphenol A, Hypochlorite of Sodium and Ethanol in the *Lymnaea stagnalis*.

The results indicate the following: it's not possible to point out the preferable hour and place for laying egg masses; the technique used to wash the masses does not in any way damage the eggs that are inside them; the procedure for individualizing eggs is feasible and well adapted to the needs of the embryos; it is possible that the presence

of the gelatinous matrix can effectively delay the embryonic development, however, this condition could not be validated, since contamination may have occurred in the trial, leading to the death of the embryos; there are four stages of development (Morula, Trochophora, Velliger and Hippo), with distinctive and perceptible events that allow to differentiate each other.

Regarding the toxicology tests results, it was corroborated the subsequent effects: toxics Ethanol, Formaldehyde and Sodium Hypochlorite are highly toxic to *L. stagnalis*; Thiachloprid does not cause mortality, even when applied at the maximum concentration allowed by the OECD (2014); Imidacloprid shows results that are contrary to those of other chemicals, since it causes higher mortality at the lowest concentration, rather than at its highest; the value of *Lymnaea stagnalis* LC10, LC20 and LC50 48h for Venlafaxine is 0.192 mg / L, 0.644 mg / L and 6.512 mg / L respectively; the value of *Lymnaea stagnalis* LC10, LC20 and LC50 48h for Bisphenol A is 1.15 mg / L, 2,348 mg / L 9,194 mg / L, respectively.

Thus, it is possible to conclude that the gastropod *Lymnaea stagnalis* species is a good organism to be used in toxicological tests not only because of the ease of maintenance required, but also due to the possibility of adapting the eggs and working with them in this way; its stages of development are well delineated and easy to study; the results achieved during the toxicological tests indicate that these entities are more sensitive to some toxics than *Daphnia magna*, whose LC50 values 48h are much higher than those calculated during this investigation.

Keywords: Heptadecafluorooctanesulfonic, Perfluorooctanoic, Bisphenol A, Sertraline, Venlafaxine, Imidacloprid, Thiachloprid, Sodium hipochlorite, Ethanol, Formaldehyde, aquatic gastropod, individualize eggs.

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	III
Abstract.....	V
Lista de tabelas.....	IX
Lista de imagens	IX
Lista de abreviaturas	XI
1. Introdução.....	12
1.1. Objetivo do trabalho.....	30
2. Material e métodos.....	32
2.1. Lymnaea stagnalis - A espécie selecionada.....	15
2.2. Individualização dos ovos e escolha da fase de desenvolvimento a utilizar nos testes de toxicidade	16
2.3. Manutenção da cultura de <i>Lymnaea stagnalis</i>	19
2.4. Químicos selecionados	20
2.4.1. Hipoclorito de Sódio (SH)	26
2.4.2. Formaldeído	24
2.4.3. Bisfenol A (BPA)	22
2.4.4. Etanol	23
2.4.5. Ácido Heptadecafluorooctanesulfonic (PFOS) e ácido Perfluoro-octanoico (PFOA)	21
2.4.6. Venlafaxina e Sertralina.....	28
2.4.7. Imidacloprida (IMI) e Tiaclopride	27
2.5. 1º Teste – Averiguação de qual o método mais eficaz para a lavagem e individualização dos ovos de <i>Lymnaea stagnalis</i>	32
2.5.1. Objetivo do teste.....	32
2.5.2. Procedimento	32

2.6. 2º Teste – Avaliação do desenvolvimento embrionário de ovos de <i>Lymnaea stagnalis</i> na presença ou ausência da massa gelatinosa que confere proteção aos ovos.....	33
2.6.1. Objetivo do teste	33
2.6.2. Procedimento	34
2.7. 3º Teste – Teste de toxicidade utilizando 10 compostos tóxicos	35
2.7.1. Objetivo do teste	35
2.7.2. Procedimento	35
3. Resultados e discussão	38
3.1. 1º Teste – Averiguação de qual o método mais eficaz para a lavagem e individualização dos ovos de <i>Lymnaea stagnalis</i>	38
3.1.1. Padrão temporal e preferência espacial de postura dos ovos.....	38
3.1.2. Método de lavagem e individualização dos ovos.....	40
3.2. 2º Teste - Avaliação do desenvolvimento embrionário de ovos de <i>Lymnaea stagnalis</i> na presença ou ausência da massa gelatinosa que confere proteção aos ovos.....	44
3.2.2. Reprodução e fases de desenvolvimento	47
3.3. 3º Teste – Teste de toxicidade utilizando 10 compostos tóxicos	50
3.3.1. Valores de LC50	56
4. Conclusão.....	60
5. Referências Bibliográficas.....	62
6. Anexos.....	75
Anexo I - Preparação do meio para <i>Lymnaea stagnalis</i> (Snail Water)	75
Anexo II - Métodos de lavagem e individualização de ovos	77
Anexo III - Avaliação do desenvolvimento embrionário de ovos de <i>Lymnaea stagnalis</i> na presença ou ausência da massa gelatinosa que confere proteção aos ovos.....	81
Anexo IV - Teste de toxicidade utilizando 10 compostos tóxicos.....	84
Anexo V – Eventos do desenvolvimento embrionário de <i>Lymnaea stagnalis</i>	90
Anexo VI – Fases de desenvolvimento embrionário em fotografia	96

Lista de tabelas

Tabela 1 – Concentrações de cada tóxico utilizadas para os testes toxicológicos.	36
Tabela 2 – Comparação entre os valores de LC50 48h para <i>Daphnia magna</i> encontrados na literatura e os valores de LC50 48h para <i>Lymnaea stagnalis</i> obtidos nos testes desta dissertação.	58

Lista de imagens

Fig. 1 - Desenho ilustrativo da estrutura de uma massa de ovos de <i>L. stagnalis</i> . 1-ovo coberto pela membrana vitelina; 2-fluido de albumina; 3-membrana da cápsula; 4-membrana externa da cápsula; 5- pedúnculo que liga a cápsula à massa de ovos; 6-matriz gelatinosa.	17
Fig. 2 – Aspeto geral de parte de uma massa de ovos contendo ovos dentro e de ovos individualizados. Fotografia capturada através de uma lupa com ampliação de 50x. .	17
Fig. 3 – Número de massas de ovos total que foi encontrado a cada do ensaio. Nos dias 16 de abril, 23 de abril, 25 de abril e 30 de abril não foram contabilizadas massas por corresponderem a domingo e feriado.	39
Fig. 4 – Número total de massas de ovos encontradas para cada local onde se verificou deposição das mesmas, durante o primeiro teste.	39
Fig. 5 – Percentagem de mortalidade, eclosão e não eclosão dos ovos que se encontravam dentro da massa de ovos – controlo.	42
Fig. 6 - Percentagem de mortalidade, eclosão e não eclosão dos ovos que foram isolados.	42
Fig. 7 – Tempo médio que os ovos demoram desde a sua deposição até à sua eclosão.	43
Fig. 8 – Número total de ovos utilizados no ensaio; número total de ovos mortos; número total de ovos que eclodiram e número total de ovos que não eclodiram.	44
Fig. 9 - Número total de massas de ovos encontradas para cada local onde se verificou deposição das mesmas, durante o segundo teste.	46
Fig. 10 - Embrião de <i>Lymnaea stagnalis</i> durante a fase de desenvolvimento Mórula. Na primeira imagem o embrião apresenta 2 células; na segunda imagem o embrião aparece já com 4 células; na terceira imagem observa-se as 6 células; na última imagem o	

embrião apresenta múltiplas células. Estas imagens foram observadas e captadas numa ampliação de 50x.	48
Fig. 11 - Embrião de <i>Lymnaea stagnalis</i> durante a fase de desenvolvimento Trocófora. Na primeira imagem é possível observar a alteração da transparência do embrião; a segunda imagem corresponde ao início do aparecimento do Velum; a terceira imagem apresenta o Velum igualmente formado nas duas pontas do embrião. Estas imagens foram observadas e captadas numa ampliação de 50x.	48
Fig. 12 - Embrião de <i>Lymnaea stagnalis</i> durante a fase de desenvolvimento Velígera. Na primeira imagem verifica-se uma diferenciação do Velum na cabeça e pé; na segunda imagem mostra o desenvolvimento da cabeça; na terceira imagem é possível visualizar a zona onde se desenvolverão os olhos. Estas imagens foram observadas e captadas numa ampliação de 50x.	49
Fig. 13 - Embrião de <i>Lymnaea stagnalis</i> durante a fase de desenvolvimento Hippo. Nas primeiras duas imagens é possível observar a característica que dá nome à fase (cara em forma de hipopótamo); a última imagem corresponde à eclosão. Estas imagens foram observadas e captadas numa ampliação de 50x.	49
Fig. 14 – Mortalidade obtida para os embriões de <i>L. stagnalis</i> perante a utilização do tóxico ácido Heptadecafluorooctanesulfónico, nas diferentes concentrações estudadas.	51
Fig. 15 – Mortalidade obtida para os embriões de <i>L. stagnalis</i> perante a utilização do tóxico ácido Perfluoro-octanoico, nas diferentes concentrações estudadas.	52
Fig. 16 – Mortalidade obtida para os embriões de <i>L. stagnalis</i> perante a utilização do tóxico Bisfenol A, nas diferentes concentrações estudadas.	52
Fig. 17 – Mortalidade obtida para os embriões de <i>L. stagnalis</i> perante a utilização do tóxico Etanol, nas diferentes concentrações estudadas.	53
Fig. 18 – Mortalidade obtida para os embriões de <i>L. stagnalis</i> perante a utilização do tóxico Formaldeído, nas diferentes concentrações estudadas.	53
Fig. 19 – Mortalidade obtida para os embriões de <i>L. stagnalis</i> perante a utilização do tóxico Hipoclorito de Sódio, nas diferentes concentrações estudadas.	54
Fig. 20 – Mortalidade obtida para os embriões de <i>L. stagnalis</i> perante a utilização do tóxico Imidacloprida, nas diferentes concentrações estudadas.	55
Fig. 21 – Mortalidade obtida para os embriões de <i>L. stagnalis</i> perante a utilização do tóxico Sertralina, nas diferentes concentrações estudadas.	55
Fig. 22 – Mortalidade obtida para os embriões de <i>L. stagnalis</i> perante a utilização do tóxico Venlafaxina, nas diferentes concentrações estudadas.	56

Fig. 23 – Valores de LC10, LC20 e LC50 48h obtidos para os tóxicos Venlafaxina e Bisfenol A para a espécie *L. stagnalis*. 57

Lista de abreviaturas

AcH	Acetilcolina
APIAM	Associação Portuguesa dos Industriais de águas minerais naturais e de nascentes
ATSDR	The Agency for toxic Substances and Disease Registry
BCME	Bis - chloromethylether
BPA	Bisphenol A
DHHS	The Departament of health and Human Services
EFSA	European Food Safety Authority
EPA	US Environmental Protection Agency
ETAR	Estação de tratamento de águas residuais
EUA	Estados Unidos da América
IARC	The international Agency of Research on Cancer
IMI	Imidacloprida
NIH	National Institute of Environmental Health Sciences
NHANES III	The third National Health and Nutrition Examination Survey
PET	Polietileno tereftalato
PFCs	Composto perfluorados
PFOA	Ácido Perfluoro-octanoico
PFOS	Ácido Heptadecafluorooctanesulfónico
PPCPs	Pharmaceutical and personal care products
PTSD	Stress pós-traumático
SH	Hipoclorito de Sódio
SSRI	Selective Serotonina – neuptake inhibitor

1. Introdução

O planeta Terra é rico em água, sendo que 72% da sua superfície encontra-se coberta por este recurso. Os oceanos apresentam a maior parcela de água do planeta (97%), porém, apenas 3% da água presente no planeta é doce. Dentro destes 3% de água doce, 98% pode ser encontrada em calotes polares ou lençóis freáticos enquanto que os restantes 2% são apresentados em forma de lagos, rios, atmosfera, corpos biológicos ou produtos manufacturados. Dessa água doce, apenas 0.01% pode ser usada diretamente pelo Homem (Azizullah *et al.*, 2011).

Segundo Diderich (2003), as fontes de água doce no planeta estão a esgotar-se rapidamente e, somando-se isso ao crescimento populacional, à poluição e ao aquecimento global, estas serão reduzidas para um terço nos próximos 20 anos. Dados das Nações Unidas, citados por Carr (2000), afirmam que nos próximos 50 anos, 40% de toda a população mundial viverá em países que enfrentam stress hídrico ou escassez de água.

Para Collins *et al.* (2009) escassez é definida como a situação em que o equilíbrio entre a disponibilidade de água utilizável e a procura por esta atinge um ponto crítico. Contudo, para além dessa escassez, também se começa a observar, nos países desenvolvidos, uma deterioração ao nível da qualidade da água (Kivaisi, 2001).

Esta é uma substância com uma importância inigualável, não só pelo fato de ser necessária para a sobrevivência de todas as espécies, como pelo fato do seu interesse científico, uma vez que serviu como base para o desenvolvimento das primeiras formas de vida na Terra (Kasting, 1993).

A água é o habitat de inúmeras espécies conhecidas, número que tem vindo a aumentar a cada ano que passa. A sua degradação coloca sérios problemas ecológicos e, para proteger não apenas a saúde humana, mas também os ecossistemas naturais, é necessário determinar a toxicidade das substâncias poluentes e detetar rapidamente situações de contaminação ambiental (Storey *et al.*, 2011). Dessa forma, a preservação da água e dos ambientes aquáticos é uma das preocupações a nível global que mais se tem vindo a desenvolver.

A Toxicologia é o campo da ciência que procura compreender os efeitos adversos que determinadas substâncias químicas podem ter nos organismos vivos (Chapman, 2002). Permite-nos estudar a ação tóxica dos diferentes compostos, percebendo assim os

mecanismos de ação dos mesmos, os efeitos negativos e os tratamentos que estes possam ter, bem como ajudar na deteção e mitigação dos problemas deles resultantes.

Para avaliar a forma como estes agentes tóxicos afetam os organismos vivos, são realizados testes toxicológicos. Estes são usados para determinar as concentrações de uma substância e o tempo de exposição necessário para produzir efeitos críticos, tais como mortalidade, alterações no crescimento ou reprodução (Wright e Welbourn, 2002, como referido em Fernandes, 2014). Podem ainda ajudar a entender o modo de ação e o tipo fisiológico ou outro tipo de efeitos das substâncias químicas nos organismos (Chapman, 2002).

Os testes de toxicidade estão divididos em agudos, que são realizados em curtos períodos de tempo (48h ou 96h) e que, geralmente, são determinados pela concentração letal mediana (LC50), ou seja, a concentração letal para 50% dos indivíduos aos quais foi administrado um produto tóxico; e crónicos, que são executados por longos períodos de tempo (por exemplo 21 dias) e nos fornecem dados como a concentração ou dose sem efeito observável (NOEC), isto é, máxima concentração na qual não se registam diferenças significativas em relação ao controlo, e a concentração ou dose com menor efeito observável (LOEC), que significa, concentração mínima na qual se registam diferenças significativas em relação ao controlo (Wright e Welbourn, 2002, como referido em Fernandes, 2014).

Tanto os testes toxicológicos agudos como os crónicos são realizados em laboratório e não são concebidos para prever efeitos sob condições naturais, uma vez que o regime de exposição não representa as condições de exposição no mundo real. Porém, também é possível realizar testes de toxicidade em campo, sendo designados por testes ecotoxicológicos.

A ecotoxicologia é o estudo dos efeitos nocivos dos produtos químicos sobre os ecossistemas e inclui efeitos sobre os indivíduos e consequentes efeitos nos níveis populacionais e acima (Walker et al., 2012). Os testes toxicológicos permitem uma melhor compreensão dos efeitos das substâncias químicas sobre os organismos, pois são realizados sob condições naturais de exposição (Chapman, 2002).

De uma forma geral a monitorização da água pode ser conduzida segundo métodos químicos (envolvem todas as análises químicas), físicos (temperatura, turbidez, pH, entre outros) e biológicos (uso de seres vivos usados como indicadores de forma a ser possível perceber os efeitos específicos de um contaminante ou compreender o estado de um ecossistema).

Bioindicadores são organismos usados para monitorizar o meio ambiente e os ecossistemas (Gonzalez et al., 2009, como referido em Fernandes, 2014) e muitas vezes são selecionados pela sua grande sensibilidade, já que são os primeiros organismos a sofrer repercussões após o seu habitat sofrer uma destabilização (Lazorchak and Josephs, 2003).

A escolha destes organismos é feita de modo a preencher alguns requisitos: deve ser de fácil manutenção em laboratório; apresentar uma ampla e abundante distribuição; ostentar uma auto-ecologia, fisiologia e etologia bem conhecidas; exibir importância ecológica, recreativa ou comercial; permitir generalizações; representar uma ampla gama de sensibilidades; ser autóctones ou representativo do ecossistema a estudar; possibilitar uma maior facilidade de comparação de resultados e maior fiabilidade na determinação de fatores de segurança entre diferentes espécies.

Os organismos aquáticos têm sido amplamente aplicados como indicadores biológicos em diversos estudos, tanto para monitorização da água como para desenvolver e melhorar critérios de qualidade da água de forma a proteger os ecossistemas e os próprios seres que habitam o meio aquático (Munley et al., 2013). Os primeiros modelos experimentais empregues nas investigações foram peixes, tendo o peixe-zebra (*Danio rerio*) ganho uma atenção especial devido às suas características, persistindo ainda hoje como principal escolha em variadas pesquisas (Van der Schalie et al., 2001). No entanto, outros organismos, nomeadamente de menores dimensões, começaram a ser utilizados, como é o caso de bivalves (Slooff et al., 1983; Borcharding, 1994; Sluyts et al., 1996; Borcharding and Jantz, 1997), bactérias (Kramer and Botterweg, 1991) e dafnídeos (Hendriks and Stouten, 1993).

Os gastrópodes são organismos importantes do ponto de vista ecológico (Rittschof and McClellan-Green, 2005) e estão a começar a ser, cada vez mais, usados em testes de toxicidade devido à possibilidade de utilizar todas as etapas de desenvolvimentos nos testes (Ducrot et al., 2014). Neste estudo foi decidido que se utilizaria a espécie *Lymnaea stagnalis*, um gastrópode aquático, uma vez que: é uma espécie ubíqua; com ampla distribuição geográfica; fácil de manter em laboratório; com capacidade para trabalhar com todas as fases de desenvolvimento, incluindo os estágios mais iniciais; e que começa a ser bastante utilizado por investigadores, o que permite a obtenção de literatura para comparar resultados.

2.1. *Lymnaea stagnalis* - A espécie selecionada

Lymnaea stagnalis (Linnaeus, 1758) é uma espécie de gastrópode aquático pulmonado, cujo comprimento médio da concha adulta varia na faixa de 2 a 6 cm. Em média o seu ciclo de vida tem a duração de um ano a dois, atingindo a maturação mês e meio após a sua eclosão. É um animal detritívoro que, no seu habitat natural, alimenta-se de plantas, algas e micro-organismos (Bandow and Weltje, 2012).

Esta espécie é bastante comum na Europa, Ásia e Norte da América, habitando reservatórios de água doce lênticos, cujo pH se encontra entre 6.0 e 7.0. É facilmente mantida em laboratório, o que o torna um bom organismo para ser utilizado em diversos ensaios laboratoriais (Horstmann, 1957; Joosse and Lever, 1959; Pullan, 1972; Merenyi, 1980; van den Steen et al., 1969, como referido em Dettlaffn and Vassetzky, 1990).

É um ser hermafrodita, porém, apesar de poder efetuar autofertilização, a fertilização cruzada é a técnica mais frequentemente empregue para a reprodução (Jarne et al., 2010, como referenciado em Ducrot et al., 2014), chegando a armazenar esperma entre um a três meses (Loose and Koene, 2008).

Ocorrida a fertilização, estes gastrópodes colocam uma quantidade de ovos variável, protegidos por um invólucro de matriz gelatinosa, a massa de ovos. Esta fornece a proteção necessária aos ovos contra os agentes externos (desde secura, variação de temperatura e pH, toxinas ambientais e potenciais predadores), para além de ainda ser a grande fonte de nutrientes dos embriões. Quando se encontra acabado de colocar, este invólucro apresenta uma coloração opaca e uma textura bastante delicada, situação que muda passado uma a duas horas, acabando por se tornar translúcido e mais resistente.

Uma das características a ter em consideração é a possibilidade de funcionarem como hospedeiros intermediários de diversos parasitas trematódes (Esch et al., 2001; Esch et al., 2002), como por exemplo *Fasciola hepática* (Ünlü et al. 2005) e *Echinostoma* (Chavan et al. 2016), sendo recomendado a utilização de caracóis de culturas estabelecidas para realizar testes de toxicidade.

Existem já múltiplos ensaios realizados com esta espécie, sendo que a maioria recai no estudo de como estes animais reagem a certos metais (Coeurdassier et al., 2004; Grosell and Brix, 2009; Ng et al., 2011; Brix et al., 2012; Kayange, 2013; Leonard and Wood, 2013; Munley et al. 2013; Atli and Grosell, 2016), mas também há investigações realizadas com detergentes (Mazur et al., 2013), com Nitrito e Nitrato (Soucek and

Dickinson, 2012), com nanopartículas (Hudson, 2013; Croteau et al. 2014), com pesticidas/herbicidas/fungicidas/moluscicidas (Ünlü et al., 2005; Coutellec et al., 2008; Fidler, 2015; Rouissat et al. 2015; Hallett et al. 2016) e até foi realizado um estudo sobre hibridização *in situ* (Hohagen et al., 2015). Alguns destes ensaios demonstram a sensibilidade deste organismo, chegando a ser ou dos mais sensíveis ou mesmo o mais sensível (Grosell et al., 2006; De Schamphelaere et al., 2008; Schlekert et al., 2010; Brix et al., 2012).

Uma vez que *L. stagnalis* é uma fonte de comida de vários animais como pássaros, peixes, répteis e mamíferos (Hoang et al., 2008), ao serem empregues nos testes toxicológicos, é possível perceber como, a contaminação destes gastrópodes, pode afetar negativamente a cadeia alimentar, o que acarreta efeitos nocivos para os ecossistemas.

A escolha desta espécie foi devida a alguns fatores decisivos tais como: a elevada taxa de produção de massas de ovos (Bandow & Weltje, 2012); o número de postura destas massas por indivíduo (correspondente a aproximadamente 0,5 massas de ovos por dia); a facilidade de manutenção da cultura; a possibilidade de estimulação da ovulação através da manipulação de fatores externos (Van der Steen, 1970); a já existência de testes de reprodução padronizados pela OCDE que utilizam esta espécie (OECD, 2016); a facilidade com que se pode estudar/observar todo o desenvolvimento embrionário, uma vez que, a massa de ovos não apresenta coloração, sendo completamente transparente; a possível individualização dos ovos, existindo a hipótese de sobrevivência dos mesmos sem permanecerem rodeados pela matriz gelatinosa e a existência de literatura para ser possível comparar e discutir os resultados.

Os indivíduos de *Lymnaea stagnalis* foram adquiridos através de uma primeira geração cedida pela Universidade de Sheffield, porém, os indivíduos utilizados em todos os testes toxicológicos realizados, são gerações que foram obtidas depois dessa primeira geração, já nos laboratórios da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

2.2. Individualização dos ovos e escolha da fase de desenvolvimento a utilizar nos testes de toxicidade

Em *Lymnaea stagnalis*, como em muitos outros gastrópodes, os ovos quando são depositados, encontram-se rodeados por um invólucro com uma matriz gelatinosa que fornece proteção e nutrientes para o bom desenvolvimento dos embriões.

Seguindo as definições de Plesch et al. (1971), como referido em Marois and Croll (1991), a cápsula diz respeito às membranas que envolvem cada óvulo individual e o seu fluido perivitelino, enquanto a massa de ovos é a estrutura agregada de muitas cápsulas de ovos embutidas numa matriz gelatinosa e rodeadas por membranas externas.

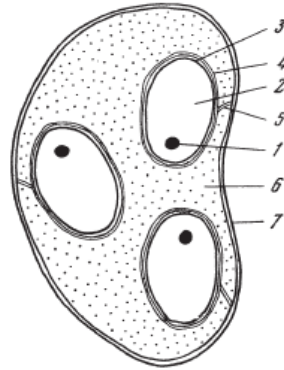


Fig. 1 - Desenho ilustrativo da estrutura de uma massa de ovos de *L. stagnalis*. 1-ovo coberto pela membrana vitelina; 2-fluido de albumina; 3-membrana da cápsula; 4-membrana externa da cápsula; 5- pedúnculo que liga a cápsula à massa de ovos; 6-matriz gelatinosa.

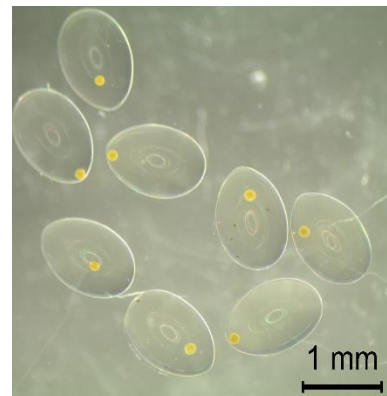
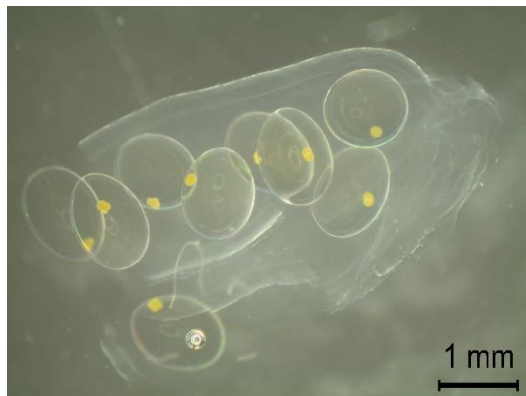


Fig. 2 – Aspeto geral de parte de uma massa de ovos contendo ovos dentro e de ovos individualizados. Fotografia capturada através de uma lupa com ampliação de 50x.

A finalidade dos testes toxicológicos é determinar qual a concentração de uma dada substância e o tempo de exposição necessários para produzir efeitos críticos num organismo vivo. Dessa forma, é necessário que os químicos utilizados nesta investigação, afetem de alguma forma os indivíduos de *L. stagnalis*. A existência de uma proteção natural que circunda os embriões poderá, de certa forma, reduzir o efeito dos tóxicos sobre estes, acabando por reduzir a sensibilidade dos embriões aos mesmos. Assim, foi necessário recolher os ovos de dentro da massa de ovos – individualização

dos ovos, de forma a que a proteção recebida por esta camada, não interferisse com os resultados dos testes.

Diferentes autores utilizam métodos divergentes para fazer a individualização, sendo que não existe um procedimento específico a utilizar, a melhor forma de verificar qual é o método que melhor se adapta às condições é experimentar as diferentes possibilidades e estudar quais as agressões mecânicas que os ovos sofrem de maneira a que seja possível realizar adaptações e, assim, tornar o método mais eficaz.

É crucial que ocorra uma boa individualização dos ovos, uma vez que para poderem ser utilizados em testes definitivos, estes devem de verificar certas características, como por exemplo, um baixo índice de deformação, de modo a que seja evitado ao máximo a ocorrência de mortalidades, permitindo que o estudo seja válido. A mortalidade é definida como a coagulação de embriões ou a cessação do batimento cardíaco (Das e Khangarot, 2011).

Clement (1952) procedeu à individualização de forma simples: pressionando a massa de ovos até os ovos saírem; Marois and Croll (1991) empregaram papel absorvente, onde foram friccionando os ovos; Barsi et al. (2014) utilizaram apenas uma pipeta de Pasteur para extrair os ovos; Hallett et al. (2016) seguiu os passos de Liu et al. (2003), que primeiro executou um corte na matriz gelatinosa e seguidamente retirou os ovos com auxílio de um par de pinças. Existem ainda autores que procederam à realização dos testes sem individualizar os ovos, por exemplo Mazur et al. (2013; 2016) realizou o ensaio apenas danificando a massa de ovos, de maneira a que as substâncias tóxicas conseguissem penetrar na massa, e dessa forma, chegar aos ovos, enquanto Rapado et al. (2013), simplesmente procedeu aos testes sem danificar de forma nenhuma a massa de ovos.

Para além da preocupação da individualização dos ovos, também se teve de ter em conta a fase de desenvolvimento com que se irá trabalhar. Ora, é sabido que, na generalidade, os embriões são mais sensíveis a tóxicos que os respetivos indivíduos adultos que os originam (Bandow & Weltje, 2012), mesmo quando esses químicos estão presentes em concentrações baixas (Dobrowolski, 1976; Vaughan and Egmond, 2010). Dessa forma, durante a realização desta tese, foram sempre utilizados embriões que se encontravam na fase de Mórula e que mesmo assim não tivessem sido colocados a mais de 24 horas.

Ao aplicar os tóxicos nos embriões e acompanhar o seu desenvolvimento até à eclosão, é possível comparar eventuais aparecimentos de deformações e mortalidades. Por esta

razão, realizar ensaios toxicológicos com embriões como organismo modelo aparenta ser relevante, uma vez que efeitos adversos na embriogénese, provocados por determinado composto ou compostos testados, podem ser diretamente estudados (Bandow & Weltje, 2012).

Dos testes foram excluídos todos os ovos que se encontrassem visivelmente danificados, mortos ou que apresentassem deformações embrionárias, como por exemplo poliembrionia, ovo não fertilizado, ovo com albúmen danificado ou célula embrionária sem albúmen. Estas anomalias podem ser visualizadas através de fotografias disponíveis no Anexo II.

2.3. Manutenção da cultura de *Lymnaea stagnalis*

Sempre que se escolhe a espécie mais indicada para utilizar nos ensaios, é necessário garantir a existência de animais em quantidade suficiente até ao final da investigação. A melhor forma de cumprir esse requisito é proceder à manutenção de uma cultura em laboratório.

Para que a cultura se mantenha saudável e duradoura deve-se ter em atenção alguns aspetos: o recipiente escolhido para armazenar os animais deve ser adequado, com espaço suficiente para que os indivíduos possam crescer, movimentar-se e desovar livremente; a quantidade de meio utilizado deve ser de pelo menos 0.5 L por cada indivíduo; deve ser providenciado um arejamento constante e água corrente, o que, caso se verifique, permite que se efetue apenas duas mudas de água por semana (Patrusheva and Sokolina, 1969; Mooij-Vogelaar and van der Steen, 1973; van den Steen et al., 1969 como referido em Dettlaffn and Vassetzky, 1990); a alimentação pode variar entre cenouras, folhas de rabanete, pepinos, repolho e diversas plantas aquáticas, porém, esta espécie tem um gosto preferencial por folhas de alface; o fotoperíodo deve ser de no mínimo 12h de luz – 12h de escuridão.

Segundo o teste de reprodução de *Lymnaea stagnalis* proposto pela OCDE (2016), pode utilizar-se dois meios diferentes na cultura, água da torneira ou água reconstituída. No caso de se optar por utilizar água de torneira é necessário proceder primeiro a uma filtração com carvão de forma a ocorrer uma descloração. Nesta investigação, porém, optou-se pela utilização de água reconstituída (*Snail Water*), que foi produzida tal como é indicado na diretriz, podendo o procedimento ser visto no Anexo I.

Durante os primeiros dois testes, de forma a ser mais fácil a verificação de massas de ovos, foram utilizados frascos de vidro com capacidade de 3L para servir como recipiente para colocar os indivíduos de *L. stagnalis*. Foram empregues três frascos que continham 1L de *Snail Water* e quatro gastrópodes, cada um. Os gastrópodes selecionados para colocar nos recipientes de vidro foram retirados da cultura já existente, correspondendo aos adultos de maior tamanho encontrados.

As culturas foram mantidas dentro de uma câmara de cultura, onde a temperatura foi regulada nos 20°C e com um fotoperíodo de 12h de luz-12h de escuridão. A alimentação consistiu em folhas de alface *ad libitum*, que, apesar de não ser a sua dieta natural, serve como uma alternativa controlada e confiável, o que facilita a preservação da cultura (Kimberly and Salice, 2012). Todos os frascos foram ainda mantidos com arejamento contínuo. A limpeza do fundo do frasco de vidro e a substituição do meio de cultura foram efetuadas duas vezes por semana. Para retirar as fezes recorreu-se a uma pipeta Pasteur.

Para o terceiro teste, como era necessário um elevado número de massas de ovos, realizaram-se algumas alterações na cultura: em vez de se utilizar recipientes de vidro com quatro caracóis, utilizou-se um aquário com doze caracóis juntos (aumentando desta forma a possibilidade de reprodução); o fotoperíodo foi alterado para 16h luz – 8h escuridão; a temperatura foi aumentada gradualmente para os 25°C; a substituição do meio passou a ser feita uma vez por semana; como a câmara de cultura foi necessária para outros projetos, a cultura foi mantida em um laboratório fechado onde a temperatura ambiente era controlada para se manter nos 25°C.

2.4. Químicos selecionados

De forma a ser possível realizar os testes de toxicidade em *Lymnaea stagnalis* foram selecionadas dez substâncias químicas, de diferentes grupos químicos, para servirem como tóxicos e ser possível observar os efeitos que cada um provoca nestes indivíduos.

Os químicos utilizados foram: ácido Heptadecafluorooctanesulfónico, ácido Perfluorooctanoico, Bisfenol A, Etanol, Formaldeído, Hipoclorito de Sódio, Imidacloprida, Sertralina, Tiaclopride e Venlafaxina.

A escolha destas substâncias tóxica deveu-se a fatores como: acessibilidade, uma vez que a maior parte dos químicos já tinham sido adquiridos anteriormente; facilidade de manuseamento durante a preparação das diferentes concentrações; serem na sua

maioria tóxicos amplamente utilizados pelo Homem no seu dia a dia; constituirão uma ameaça para o meio aquático e espécies que nele habitam; a existência de valores de LC50 48h para *Daphnia magna*, o que permite uma comparação de resultados; a presença de literatura para conhecer melhor as substâncias empregues no estudo; a variedade existente, uma vez que todos os tóxicos são diferentes entre si, pertencendo a diferentes famílias químicas.

A secção seguinte apresenta algumas características e informações sobre cada um dos tóxicos.

2.4.5. Ácido Heptadecafluorooctanesulfónico (PFOS) e ácido Perfluorooctanoico (PFOA)

Tanto o PFOS como o PFOA estando inseridos na categoria dos químicos conhecidos como PFCs (compostos perfluorados) e, uma vez que são substâncias criadas pelo homem, não ocorrem de forma natural no meio ambiente. Devido à sua estrutura química, estes compostos são muito estáveis no ambiente, sendo resistentes à biodegradação, foto oxidação, fotólise direta e hidrólise (3M 2000; OECD 2002, 2007; EPA 2008a; Schultz et al. 2003, tal como referido em ATSDR, 2018). Para além disso, a presença destes tóxicos foi detetada em vários locais do mundo, incluindo oceanos e até no Ártico, situação que indica ser possível o transporte a longa distância (Armitage et al. 2006; Prevedouros et al. 2006; Barber et al. 2007; Wania 2007; Wei et al. 2007a; Yamashita et al. 2005 e 2008, tal como referido em ATSDR, 2018).

Graças à sua capacidade de impermeabilidade à água e óleos, estas substâncias são amplamente utilizadas em fórmulas de revestimento e proteção de superfícies, ou seja, são empregues em produtos como o papel, carpetes, couro, pele, têxtil e até mesmo em certas soluções espumíferas de combate a incêndios (Kissa 2001; Hekster et al. 2003; Schultz et al. 2003, tal como referido em ATSDR, 2018).

É possível detetar ambos os componentes no ar, solo e água, sendo que a contaminação pode chegar até aos lençóis freáticos (Davis et al. 2007; Prevedouros et al. 2006, tal como referido em ATSDR, 2018). A absorção destes tóxicos dá-se por via oral, inalação, dermal ou através de contato com água, ar ou solos infetados. Podem provocar hipertensão e pré-eclampsia na gravidez; aumento de colesterol, de risco de doença de tiroide e asma; diminuição da resposta dos anticorpos às vacinas e de fertilidade; cancro testicular e problemas tanto no fígado como nos rins (ATSDR 2018).

Entre 1999 e 2000, a concentração dos dois tóxicos encontrada nas populações dos EUA era de 5.2 ng/ml (PFOA) e de 30.4 ng/ml (PFOS), porém, uma vez proibida a produção ou importação dos químicos no país, de 2013 a 2014 observou-se um decréscimo das concentrações das substâncias, passando para 1.94 ng/ml (PFOA) e 4.99 ng/ml (PFOS) (CDC 2018).

Existem, ainda, estudos realizados onde foi possível detetar a presença de PFOS e PFOA tanto no leite materno (0.360-0.639 ng/ml e 0.210-0.490 ng/ml, respetivamente), como no cordão umbilical (4.9-11 ng/ml e 1.6-3.7 ng/ml, respetivamente) (Inoue et al. 2004; So et al. 2006b; Apelberg et al. 2007a, 2007b; Fei et al. 2007; Kärman et al. 2007; Midasch et al. 2007; Völkel et al. 2008, tal como referido em ATSDR, 2018). Assim, tanto a EPA – US Environmental Protection Agency (2016e, 2016f, tal como referido em ATSDR, 2018) como a IARC - The International Agency for Research on Cancer (2017), tal como referido em ATSDR (2018), concluíram que o ácido Heptadecafluorooctanesulfónico e o ácido Perfluoro-octanoico são carcinogénicos.

Devido ao transporte dos químicos através das correntes marinhas, os seres vivos também são negativamente afetados, já que estas substâncias são capazes de entrar nos sistemas dos seres aquáticos e afetar, desta forma, toda a cadeia alimentar. Para além disso, foi reportado que a bioacumulação aumenta conforme vai subindo na cadeia alimentar (Kannan et al. 2005; Smithwick et al. 2005a, 2005b; Houde et al. 2006b; Smithwick et al. 2006; Furdui et al. 2007; Kelly et al. 2007; de Vos et al. 2008; Martin et al. 2004b, tal como referido em ATSDR, 2018). Existem ainda estudos que revelam que, para se começar a observar efeitos adversos nos animais, basta uma ingestão oral de 0.01-0.05 mg/kg/dia de PFOA e de 0.001-0.005 mg/kg/dia de PFOS (ATSDR, 2018).

2.4.3. Bisfenol A (BPA)

O Bisfenol A é um composto orgânico com dois grupos funcionais de fenol, classificado como disruptor endócrino, ou seja, é uma substância química capaz de alterar a função do sistema endócrino causando efeitos adversos, uma vez que imita o funcionamento da hormona do estrogénio. Este componente é utilizado para fabricar plásticos de policarbonato, resinas epóxi e retardantes de chamas, podendo ser encontrado em diversos objetos do dia a dia, como pratos, garrafas, biberões, recipientes de armazenamento de alimentos, latas de alimentos em conserva, tampas de garrafas, tubos de abastecimento de água, aditivos de tintas e materiais de construção e elétricos (Blankenship and Coady, 2005, como referido em Fernandes, 2014; PubChem, 2018).

A presença de BPA em materiais de armazenamento de alimentos, leva à possível passagem do mesmo para os alimentos que consumimos, tornando-nos seres facilmente expostos a este químico.

Entre 2003 e 2004, o NHANES III (The Third National Health and Nutrition Examination Survey), conduzido pelo Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (CDC), realizou um estudo com pessoas de idades a partir dos 6 anos e acabou por detetar níveis de BPA em 93% (num total de 2517 amostras) das amostras de urina analisadas (The National Institute of Environmental Health Sciences - NIH, 2017).

Uma vez que o químico é vendido em forma de pó, é necessário ter em atenção a possível formação de nuvens de pó tóxicas durante o seu manuseamento. Este tóxico é capaz de provocar irritações nos olhos, alergia na pele e dificuldade na respiração. É também suspeito de prejudicar a fertilidade e provocar problemas nos fetos (carcinogénico e mutagénico), para além de ser tóxico para a vida aquática a longo prazo.

Existem já alguns países onde se verifica uma preocupação acentuada relativamente ao BPA, estando já proibido o seu uso, por exemplo, na Dinamarca, Canadá, Costa Rica e Estados Unidos. Em Portugal, segundo a Associação Portuguesa dos Industriais de Água Minerais Naturais e de Nascente (APIAM), todas as garrafas produzidas são livres de Bisfenol A, contendo como matéria prima Polietileno Tereftalato (PET) ao invés de BPA (Notícias ao minuto publicada a 24/06/2015). A necessidade de manter este químico afastado do nosso organismo é ainda mais urgente quando se trata de crianças, uma vez que a possibilidade da ocorrência de complicações mutagénicas e carcinogénicas são maiores, assim, segundo o Decreto-Lei n.º 55/2011, fica proibido o fabrico de biberões de plástico que contenham BPA, pondo em prática a Diretiva n.º 2011/8/UE, da Comissão Europeia.

Uma forma de se verificar se o material de plástico contém Bisfenol A, é observar o símbolo de reciclagem presente na embalagem, pois, segundo o NIH se dentro do círculo for apresentado o número 3 ou o número 7, é indicativo da presença deste tóxico.

2.4.4. Etanol

Trata-se de uma substância no estado líquido, incolor e com um intenso odor, classificada como altamente inflamável, carcinogénica e mutagénica. O etanol pode ser produzido industrialmente, como petroquímico (através da hidratação do etileno), ou de

forma biológica (pela fermentação de açúcares). É inserido na produção de plásticos, polimentos, cosméticos, combustíveis (como aditivo), solventes e frequentemente empregue como agente anti-infecioso (Strohm and Sweet, 2005, como referido em Fernandes, 2014).

Devido a ser volátil, rapidamente é absorvido pelo estômago ou intestino, transpondo para a corrente sanguínea e alcançando todo o corpo. Uma vez dentro do corpo humano, é convertido em Acetaldeído, sendo este componente ainda mais tóxico que o próprio Etanol, estando ligado à maioria dos efeitos clínicos observado quando ocorre ingestão de álcool. Devido à produção de Acetaldeído, o risco de desenvolver cirrose no fígado, múltiplas formas de cancro e alcoolismo é aumentado (Pubchem, 2018).

No nosso corpo, podem ser detetadas pequenas quantidades de Etanol devido à sua produção endógena pela microflora intestinal, ocorrida através da fermentação anaeróbica, porém a maior parte da sua deteção é devido ao seu consumo como bebida alcoólica. Existem diversas doenças e desordens associadas ao consumo deste composto, como é o caso de autismo, doença celíaca, doença renal policística autossómica dominante, doença de Crohn, síndrome de intestino irritável, cancro de pulmão, problemas no fígado e rins, entre outras. Para além disso, tem um efeito depressivo sobre o sistema nervoso central, levando a que seja caracterizado como uma droga, já que possui efeitos psicoativos.

Os efeitos desta substância em humanos passam por doenças congénitas e malformações durante a gravidez (síndrome alcoólico fetal), incoordenação muscular, deficiência visual, diminuição do tempo de reação, mudanças de comportamento e intoxicação grave (bastando um nível de álcool no sangue inferior a 0.1%), desde vómitos a náuseas e hipotermia, coma (quando os níveis de álcool no sangue estão entre 0.3% e 0.4%), hipertensão e morte (quando o nível de álcool no sangue é superior a 0.4%). Uma vez que é um tóxico inflamável e volátil, é necessário ter em atenção a formação de eventuais gases tóxicos, que são altamente irritáveis para a pele, olhos e trato respiratório, podendo provocar sufocação (Strohm and Sweet, 2005, como referido em Fernandes, 2014; Pubchem, 2018).

2.4.2. Formaldeído

O formaldeído é um gás altamente reativo, poluente e inflamável que pode ser produzido tanto de forma natural (decomposição de material vegetal ou em alimentos não cozinhados), como através da atividade humana. Segundo The International Agency for

Research on Cancer (2006) (IARC - Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro), soluções aquosas deste químico são frequentemente parte integrante em resinas usadas para produtos em madeira, agentes de limpeza, papel, fertilizantes, cigarros, cosméticos, tintas e vernizes, conservantes alimentares e de espécimes biológicos, elixires bucais e pastas de dentes, entre outros. Na sua forma natural apresenta-se como um gás, porém, as soluções comerciais são aquosas, contendo ainda Metanol de forma a evitar formação de polímeros.

Devido à sua enorme propensão para a combustão, é necessário ter o devido cuidado com os vapores gerados, dióxido de carbono e monóxido de carbono, uma vez que são altamente tóxicos. Este componente pode ainda reagir com o cloreto de hidrogênio ou outros cloretos inorgânicos, acabando por formar Bis-chloromethylether (BCME), um conhecido componente carcinogénico (Pubchem, 2018).

Alguns estudos realizados com seres humanos expostos, repetidamente, ao ar contaminado com formaldeído, no local de trabalho, concluíram que os mesmos se tornavam mais propícios ao aparecimento de cancro. Os mesmos estudos foram posteriormente realizados com ratos em laboratório e obtiveram a certeza que, quando estes se encontravam em ambiente contaminado pelo químico, desenvolviam cancro.

Assim, The Department of Health and Human Services (DHHS - Departamento de Saúde e de serviços Humanos) e The International Agency of Research on Cancer (IARC - Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro), chegaram à conclusão que, o Formaldeído é um composto carcinogénico. Devido a esta classificação, existem já alguns locais onde a sua utilização é proibida, como é o caso da Europa, Austrália ou Japão (Amorim, 2014).

É de referir que, quando inalado, concentrações a partir de 0.1 ppm já provocam irritações no nariz e olhos, aumento do risco de asma e/ou alergias, enquanto que, por sua vez quando ingerido, basta uma concentração de 50 mg/kg/dia para afetar o fígado, rins, o trato gastrointestinal e o peso corporal (The Agency for Toxic Substances and Disease Registry – ATSDR, 2008).

Outro exemplo a mencionar é a recente utilização deste químico como controlo de protozoários, fungos e parasitas em produções de aquacultura, situação que representa um forte risco ecológico, já que, os efluentes produzidos nestas aquaculturas levam à

morte de fitoplâncton, zooplâncton e organismos bênticos que se encontrem expostos a estes resíduos (Hohreiter and Rigg, 2001).

2.4.1. Hipoclorito de Sódio (SH)

O Hipoclorito de Sódio, proveniente do cloro, também designado comumente por lixívia (quando dissolvido em água), é um dos compostos mais antigos utilizados a nível mundial em diversas atividades, desde desinfecção de água de consumo, piscinas e águas residuais, no controlo de inúmeras doenças infecciosas, como ainda em atividades agrícolas, hospitalares e domésticas. Este químico é empregue devido principalmente às suas capacidades desinfetantes e ao seu baixo custo de produção (Clasen and Edmondson, 2006; Magalhães *et al.*, 2007; Nimkerdphol and Nakagawa, 2008).

Uma vez que é um agente oxidante forte ($\text{pH} \simeq 12$), tem como característica a alta eficácia na eliminação de bactérias, vírus, fungos, esporos, algas e protozoários (Hidalgo *et al.*, 2002; Emmanuel *et al.* 2004). É um composto muito instável, sendo rapidamente degradado pela temperatura e luz (Elia *et al.*, 2006) e, apesar de não ser um componente explosivo, a situação pode alterar caso o produto seja exposto a altas temperaturas, o que provoca um aumento de pressão, levando também à formação de gases tóxicos devido ao componente Cloro.

Para além de ser extremamente corrosivo e prejudicial para o meio ambiente, pode ainda provocar severos danos à saúde humana, tais como, irritações tanto na pele e olhos como nos tratos respiratório e digestivo, quando ingerido, inalado ou manuseado de forma incorreta. Desta forma é necessário manusear de forma cuidada, utilizando vestuário quimicamente resistente, luvas e óculos. Deve-se ainda ter equipamento de respiração autónoma pronto a utilizar em caso de alguma exposição ao químico (Alves, 2005).

A evacuação do SH no meio ambiente representa uma preocupação a nível mundial, uma vez que, como o seu uso é inserido em variadas atividades, é de dificuldade acrescida o controlo das descargas. Este componente, mesmo quando em concentrações reduzidas, interfere negativamente com os ambientes aquáticos, incitando impactos que prejudicam os seres que habitam estes meios.

Um exemplo é o valor de Cloro Residual presente nos efluentes das ETAR que, segundo o Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto, pode atingir 1 mg/L, valor bastante elevado, uma vez que, por outro lado, Poornima et al. (2005) afirma que basta uma concentração de 0.2mg/L de NaClO para interferir com os produtores primários e, desta forma, impactar a produtividade fotossintética do fitoplâncton.

Por outro lado, no Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de agosto, referente às águas de consumo, é revelado que o valor limite de Cloro residual livre na rede de distribuição deve estar compreendido entre 0,2 e 0,6 mg/l, todavia, existem estudos epidemiológicos que demonstram a existência de uma relação entre o consumo de água tratada com Cloro e o aumento do risco de cancro, tanto gastrointestinal como no sistema urinário, para além da ocorrência de abortos espontâneos e de efeitos no sistema reprodutor (Monarca *et al.*, 2004).

2.4.7. Imidacloprida (IMI) e Tiaclopride

Tanto o Imidacloprida como o Tiaclopride são inseticidas neonicotinóides que foram inseridos no mercado pela Bayer CropScience em 1991 e 2003, respetivamente (Osterauer and Köhler, 2008; Tufi et al. 2015;). Ambos obtiveram um crescimento rápido, devido à sua capacidade de toxicidade seletiva que é capaz de afetar os invertebrados, mas que não afeta os vertebrados (Tomizawa and Casida 2003; Tomizawa and Casida 2005).

Este grupo de pesticidas foi desenvolvido para substituir os inseticidas organofosforados, apresentando uma estrutura semelhante à nicotina (Anderson et al., 2015). Atuam principalmente como um agonista dos recetores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) na membrana pós-sináptica das células neuronais dos insetos (Tufi et al. 2015).

É um potencial contaminante, tanto da água superficial, como da subterrânea, devido à sua grande solubilidade (Kidd and James 1991; Tomlin 1997, como referido em Stoughton et al. 2008) e capacidade de lixiviação, chegando a atingir o solo e como consequência, afetando as colheitas (Felsot et al., 1998; Gonzalez-Pradas et al., 1999; Armbrust and Peeler, 2002; Gupta et al., 2002; PAN Pesticides database, 2006; Fossen, 2006, como referido em Jemec et al. 2007). Estes três pontos levaram a que fossem empregues restrições ao uso deste tóxico, porém, a grande utilização deste componente, leva a que a sua presença no meio aquático seja cada vez mais presenciada. Hewitt et al. (2005), no Canadá, obteve uma concentração de IMI igual a

0.4 µg/L (como referenciado em Radwan and Mohamed, 2013), enquanto Phillips and Bode (2004) encontraram uma concentração de Imidacloprida de aproximadamente 0.13 µg/L, em dois rios dos EUA. Por sua vez, Süß et al. (2006), detetou na Alemanha uma concentração de Tiaclopride igual a 4.5 µg/L (como referido em Langer-Jaesrich et al., 2010).

O uso contínuo de pesticidas tem sido objeto de preocupação em todo o mundo, devido à sua adversidade perante organismos que não são o verdadeiro “alvo”, conduzindo a um impacto negativo nos ecossistemas (Dutra et al., 2009). Por exemplo, alguns dos organismos afetados são: *Desmodesmus subspicatus*, *Daphnia magna*, *Gammarus fossarum*, *Marisa cornuarietis* e *Chironomus riparius* (Sawasdee and Köhler, 2009; Azevedo-Pereira et al., 2011; Hayasaka et al., 2012; Malev et al., 2012).

Para além dos problemas acima descritos, verificou-se que o Imidacloprida induz potencialmente genotoxicidade, desregulação endócrina, stress oxidativo e efeitos imunotoxicológicos durante o desenvolvimento (Radwan and Mohamed, 2013) e que o Tiaclopride é suspeito de provocar cancro, danificar a fertilidade e os fetos e ainda pode causar sonolência ou tonturas, devido à sua semelhança com a nicotina (efeitos narcóticos) (Pubchem, 2018).

2.4.6. Venlafaxina e Sertralina

Tanto a Venlafaxina como a Sertralina são um inibidor da recaptação neuronal de serotonina e norepinefrina. Fazem parte dos designados SSRI (selective serotonina-reuptake inhibitor), que, devido à sua relativa baixa toxicidade e alta tolerância, são comumente selecionados como primeiro passo para os tratamentos e prevenção de vários transtornos depressivos, transtornos de ansiedade, transtorno de pânico com ou sem agorafobia, transtorno de stress pós-traumático, transtorno obsessivo compulsivo, sintomas vasomotores e dor neuropática causada por diabetes (Muth et al. 1986, como referido em Rowbotham et al. 2004; Rush et al. 2006; Pubchem, 2018).

Podem ser encontrados diversos estudos publicados que demonstram o benefício da utilização destes componentes. Um exemplo é a investigação levada a cabo por Loprinzi et al (2000), onde o foco principal, era ajudar a reduzir os sintomas vasomotores experimentado pelas mulheres. Os sintomas vasomotores traduzem-se, na linguagem comum, pelas ondas de calor sentidas durante a menopausa e devido a vários motivos, são mais problemáticos em mulheres que passaram por cancro da mama do que em mulheres que não sofreram desta condição. Chegaram à conclusão que, utilizando uma

concentração de 75 mg/dia de Venlafaxina, estes sintomas são aliviados em apenas alguns dias.

Outro exemplo é o estudo executado por Rowbotham et al. (2004), que se centrou em reduzir a dor neuropática, muitas vezes presente em pacientes que sofrem de diabetes. A neuropatia periférica traduz-se por uma disfunção dos nervos periféricos, podendo causar dor, fraqueza muscular e atrofiamento muscular. Estes investigadores concluíram que, com a toma de Venlafaxina, os efeitos de dor neuropática eram reduzidos significativamente, porém, observaram ainda, a ocorrência da alteração do ritmo cardíaco, assim como a alteração da pressão sanguínea, situação que já tinha sido alvo de preocupação na investigação realizada por Thase (1998).

Clerc et al. (1994) realizou um estudo em que comparou o efeito antidepressivo de Venlafaxina e de outro composto designado por Fluoxetina. Os resultados informaram que a Venlafaxina obtém uma maior eficácia no tratamento de depressão e melancolia. Já Entsuah et al. (2001), concluiu que a taxa de remissão de depressão, utilizando este químico, foi maior e mais rápida do que o tratamento com outro SSRI. Relativamente ao tratamento de bipolaridade, Vieta et al. (2002), foi capaz de obter melhorias ao tratar pacientes que sofriam desta doença, com Venlafaxina.

Quanto ao stress pós-traumático (PTSD), é um problema de saúde que resulta em sintomas psicológicos e fisiológicos persistentes e incapacitantes. Hoje em dia, cada vez mais, verifica-se que não é um problema apresentado apenas por soldados, mas também por cidadãos que passaram por situações traumáticas como desastres naturais, agressões físicas/sexuais e até presenciar ferimentos infligidos ou morte.

Existem já alguns estudos que indicam a utilização da Sertralina como um tratamento favorável para estas condições: Brady et al., (1995) obtiveram resultados favoráveis ao tratar pacientes que sofriam de stress pós-traumático e alcoolismo associado; Rothbaum et al., (1996) conseguiram reduzir o PTSD em mulheres vítimas de agressão sexual; Brady et al. (2000) observaram que 53% dos pacientes melhoraram com a toma de Sertralina, reduzindo em 70% os sintomas associados ao PTSD em apenas quatro semanas.

Para além do stress pós-traumático, algumas investigações refletem o benefício de tratar doentes que sofram de depressões (Reimherr et al., 1990; Fabre et al., 1995; Keller et al., 1998; Glassman et al., 2002; Mergl et al., 2018); ataques de pânico (Londborg et al., 1998; Pohl et al., 1998; Pollack et al., 1998; Lepola et al., 2003;

Bandelow et al., 2004; Pollack et al., 2007) e comportamentos obsessivo-compulsivos (Greist et al., 1995; Hoehn-Saric et al., 1997; Ninan et al., 2006).

Recentemente no Canadá, EUA e Dinamarca, procedeu-se a medições para averiguar a quantidade de SSRIs nas ETARs. Chegou-se à conclusão que a Venlafaxina é o antidepressivo que se encontra em maior concentração (Schultz and Furlong 2008; Metcalfe et al. 2010; Schultz et al. 2010; Styryshave et al. 2011, como referido em Fong and Hoy 2012), situação que não surpreende uma vez que, em 2007, a Venlafaxina foi o sexto antidepressivo mais prescrito no mercado dos Estados Unidos, com 17 milhões de prescrições (Pubchem 2018). Por outro lado, em 2005 na Dinamarca, 5% da população consumia antidepressivos, sendo que a venda de Sertralina perfazia 14% do total de vendas de antidepressivos (Styryshave et al., 2011).

Contudo, existem inúmeras investigações que demonstram os efeitos adversos dos PPCPs (pharmaceuticals and personal care products) no ecossistema aquático, mesmo depois de as águas passarem por estações de tratamento (Daughton and Ternes 1999; Calisto and Esteves 2009; Phillips et al. 2010, como referido em Fong and Hoy 2012). Os antidepressivos, incluindo os SSRIs, estão inseridos dentro do grupo de PPCPs, já tendo sido relatado a sua presença em efluentes de águas residuais e em águas superficiais (Kolpin et al. 2002; Brooks et al. 2003a; Weigel et al. 2004; Schultz and Furlong 2008; Metcalfe et al. 2010; Schultz et al. 2010, como referido em Fong and Hoy 2012).

Com o aumento da toma de antidepressivos, situação que não tem tendência a diminuir durante os próximos anos, ocorre também um aumento na libertação destes químicos para o meio ambiente através de vários fluxos de resíduos, o que acarreta severos problemas para os seres que habitam o meio aquático e, futuramente, os consumidores destes seres.

1.1. Objetivo do trabalho

A necessidade de preservar os ecossistemas, nomeadamente os aquáticos é cada vez mais importante. Sem água o Homem não sobrevive, porém sem as restantes espécies que constituem a Terra, a sobrevivência também não é possível.

Com o aumento da pressão exercida pelo Homem e o aumento do uso de substâncias prejudiciais para o meio aquático, é imperativo estudar as adversidades que estes

componentes trazem para as espécies aquáticas e, a longo prazo, às restantes espécies da cadeia alimentar.

O principal objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos adversos de dez substâncias tóxicas diferentes, utilizando para isso o gastrópode *Lymnaea stagnalis* como modelo experimental. Para isso foi necessário, primeiramente, responder a outros dois objetivos: como manusear e individualizar de forma correta os ovos colocados pelos indivíduos; quais as fases de desenvolvimento da espécie e como distingui-las.

2. Material e métodos

Esta seção encontra-se dividida em três partes, uma vez que durante esta dissertação efetuaram-se três testes principais. Em cada seção é apresentado o objetivo do trabalho assim como o procedimento realizado.

2.5. 1º Teste – Averiguação de qual o método mais eficaz para a lavagem e individualização dos ovos de *Lymnaea stagnalis*

2.5.1. Objetivo do teste

Durante o primeiro estudo foi feita uma revisão dos diferentes métodos de separação e manuseamento dos ovos de *Lymnaea stagnalis*, com a finalidade de verificar qual é o mais indicado para as sensíveis características dos ovos, do jeito que nos testes definitivos não haja interferência na mortalidade. Averiguada a melhor forma de proceder ao isolamento, foi realizada a parte experimental para ser possível validar o método de isolamento de ovos escolhido. Neste primeiro teste, pretendeu-se, ainda, investigar se existia algum padrão de postura dos ovos, tanto a nível do local onde se encontravam as massas, como na altura do dia em que eram colocadas.

2.5.2. Procedimento

Para iniciar o ensaio, começou por se verificar de hora a hora a existência de possíveis massas de ovos de maneira a que estas fossem recolhidas quando recém-colocadas. Seguidamente realizou-se uma lavagem das mesmas, utilizando água clorada, eliminando dessa forma os possíveis parasitas que se encontravam presentes nas massas de ovos. O método de lavagem foi adaptado do método descrito por Marois and Croll (1991).

Efetuada a lavagem, procedeu-se a uma divisão das massas de ovos, onde metade foi guardada numa placa de Petri com *Snail Water* (controlo) e a outra metade serviu para isolar os ovos. A individualização dos ovos foi efetuada com auxílio de uma lupa binocular Zeiss Stemi DV4, bisturi, pinças e papel de filtro.

Para proceder à individualização dos ovos, começou-se por realizar um corte ao longo do comprimento da massa, evitando tocar nos ovos, uma vez que devido à sua

fragilidade, estes arrebentam facilmente. De seguida, utilizando duas pinças de pontas arredondadas, os ovos foram retirados da massa através de um arrastamento cuidadoso, pelo papel de filtro, de forma a ficarem livres de restos da matriz gelatinosa. Esta parte do procedimento foi realizada através de uma mistura de métodos já aplicados por Marois and Croll (1991), Liu et al. (2013), Barsi et al. (2014) e Hallett et al. (2016).

Quando devidamente isolados, e verificado que os ovos se encontravam livres de qualquer tipo de malformações, foram preenchidas placas de 24 poços, onde cada poço continha 5 ovos individualizados (correspondente a metade da densidade utilizada por Liu et al. 2013), utilizando o número de poços necessário de maneira a serem aproveitados todos os ovos recolhidos. Cada poço foi preenchido com *Snail Water*, sendo o meio renovado diariamente.

Diariamente efetuou-se um registo das diferentes fases embrionárias, eventuais mortalidades e malformações, não só para ser possível ficar a conhecer o desenvolvimento de *L. stagnalis*, como também para ser possível observar as diferenças entre o tempo de eclosão e mortalidade entre os ovos individualizados e o controlo (ovos localizados no interior da matriz gelatinosa).

Procedeu-se ainda à monitorização da oviposição para averiguar se ocorria algum padrão regular tanto quanto à altura do dia em que eram colocadas as massas, como ao local onde as mesmas eram encontradas.

No anexo II é possível visualizar com maior detalhe o procedimento empregue para realizar este estudo que teve uma duração de 21 dias.

2.6. 2º Teste – Avaliação do desenvolvimento embrionário de ovos de *Lymnaea stagnalis* na presença ou ausência da massa gelatinosa que confere proteção aos ovos

2.6.1. Objetivo do teste

O segundo estudo foi concretizado para se obter uma melhor perceção de como a presença ou ausência da massa de ovos afeta o desenvolvimento embrionário. O empenho em alcançar uma melhor perceção sobre a funcionalidade desta proteção dada aos ovos, a necessidade de compreender a possível viabilidade dos ovos aquando individualizados, aliada às observações feitas durante o primeiro teste, fizeram com que

a execução deste teste se tornasse um ponto de curiosidade. Assim, pretendeu-se estabelecer uma comparação da taxa de eclosão, taxa de mortalidade dos embriões e tempo decorrido até à eclosão entre os ovos individualizados e os ovos no seu estado natural.

2.6.2. Procedimento

Ao iniciar este ensaio, o primeiro passo a realizar é verificar se existem massas de ovos antigas depositadas no aquário, pois, como é necessário utilizar apenas as massas acabadas de depositar, as mais antigas têm de ser deitadas fora para não interferir de nenhum modo. Uma vez feita esta limpeza, procedeu-se à constante verificação de novas massas de ovos, que posteriormente foram lavadas (tal como descrito no 1º teste).

Após os passos anteriores, a massa foi pesada e dividida em 6 partes aproximadamente iguais, sem danificar nenhum ovo que se encontre dentro da mesma. De seguida foi necessário preparar uma placa de 24 poços, preenchida com *Snail Water* de forma a ficar:

- Poço 1 - ovos dentro da massa de ovos (controlo);
- Poço 2 - ovos individualizados e completamente limpos de matriz gelatinosa;
- Poço 3 - ovos individualizados colocados por cima de um pedaço da massa de ovos;
- Poço 4 - ovos individualizados e completamente limpos de matriz gelatinosa com 0.08 gramas de massa de ovos cortada aos bocadinhos e colocada nos poços, mas sem tocar nos ovos;
- Poço 5 - ovos individualizados e completamente limpos de matriz gelatinosa com 0.04 gramas de massa de ovos cortada aos bocadinhos e colocada nos poços, mas sem tocar nos ovos;
- Poço 6 - ovos individualizados e completamente limpos de matriz gelatinosa com 0.02 gramas de massa de ovos cortada aos bocadinhos e colocada nos poços, mas sem tocar nos ovos.

Concluídos todos os passos, procedeu-se à observação dos ovos diariamente com auxílio de uma lupa binocular Zeiss Stemi DV4, registando todas as mortalidades e possíveis alterações ocorridas ao longo dos 21 dias em que decorreu o ensaio.

Os métodos deste teste podem ser vistos mais pormenorizadamente no anexo III.

2.7. 3º Teste – Teste de toxicidade utilizando 10 compostos tóxicos

2.7.1. Objetivo do teste

Por fim, o terceiro teste serviu para avaliar os potenciais riscos de dez tóxicos utilizados frequentemente e que acabam por ir parar ao meio aquático de algum modo. A tendência é para que, cada vez mais, o uso destes tóxicos aumente, o que leva, por sua vez, a um aumento da preocupação relativamente aos efeitos negativos que os mesmos acarretam para os seres vivos que se encontram sujeitos à contaminação, assim como os animais que se alimentam desses seres, possivelmente contaminados.

2.7.2. Procedimento

O procedimento inicial para este teste é igual ao realizado no primeiro teste: verificar a colocação de massas de ovos novas, colhê-las, lava-las e individualizar os ovos. É de referir que, uma vez que foram necessárias muitas massas de ovos para completar os 10 testes, definiu-se que apenas seriam usados ovos com no máximo 24 horas e que, por sinal, ainda não apresentassem rotação.

Neste teste foram utilizadas placas de 96 poços, onde se colocou um ovo por poço no total de seis ovos por condição. Para saber quais as concentrações a testar primeiramente foi necessário recolher na literatura disponível os valores de LC50 para todos os químicos selecionados. Uma vez que nem não existia valores de LC50 na espécie *L. stagnalis* para todas as substâncias, foram recolhidos e utilizados como valores base os valores de LC50 para 48h de *Daphnia magna*. Ficou decidido que as concentrações utilizadas seriam calculadas multiplicando o valor de LC50 para 48h para *Daphnia* por 100x, porém nunca ultrapassando os 100 mg/L de tóxico – concentração máxima permitida pela OCDE para testes agudos (OCDE, 2014). Dessa forma, as concentrações utilizadas nos testes toxicológicos, para cada químico, podem ser consultadas na tabela 1.

Tabela 1 – Valores de LC50 para 48h para *Daphnia* encontrados na literatura e concentrações de cada tóxico utilizadas para os testes toxicológicos, em mg/L.

Químico	48h LC50 <i>Daphnia</i>	1 Concentração	2 Concentração	3 Concentração	4 Concentração	5 Concentração	6 Concentração	Controlo
Bisfenol A	12.8	100	10	1	0.1	-	-	0
Etanol	10479.5	100	10	1	0.1	-	-	0
Formaldeído	29	100	10	1	0.1	0.01	0.001	0
Ácido Heptadecafluoro octanesulfónico	112	100	10	1	0.1	-	-	0
Imidacloprida	97	100	10	1	0.1	-	-	0
Ácido Perfluoro- octanoico	201.9	100	10	1	0.1	-	-	0
Sertralina	1.2	100	10	1	0.1	-	-	0
Hipoclorito de Sódio	0.04	5	0.5	0.05	0.005	0.0005	0.00005	0
Tiaclopride	88	100	10	1	0.1	-	-	0
Venlafaxina	141.3	100	10	1	0.1	-	-	0

Diariamente, os ovos foram observados e fotografados, recorrendo a uma Lupa Zeiss Stemi 2000-C que continha uma câmara Leica EC3, registando as mortalidades e eclosões. O programa utilizado para efetuar o registo fotográfico é o LAS v4.8 da Leica. Por fim, recorrendo ao SPSS Statistic 25, procedeu-se ao cálculo do LC50 para 48h para *L. stagnalis*.

Os tóxicos utilizados foram: Bisfenol A ou 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane (CAS 80-05-7) obtido da empresa Merck; Etanol (CAS 67-17-5) adquirido da empresa Fisher Chemical; Hipoclorito de sódio (CAS 7681-52-9) obtido da empresa Panreac; Imidacloprida (CAS 138261-41-3), Tiaclopride (CAS 111988-49-9), Sertralina (CAS 79559-97-0), Ácido Perfluoro-octanoico (CAS 335-67-1), Ácido Heptadecafluorooctanesulfonic (CAS 2795-39-3), Venlafaxina (CAS 99300-78-4) e Formaldeído (CAS 50-00-0) adquiridos da empresa Sigma-Aldrich.

Cada químico foi preparado no próprio dia em que foi usado, para evitar prováveis alterações dos componentes. Iniciou-se por preparar a concentração de maior valor

(concentração 1), efetuando sucessivamente diluições até à concentração mais baixa (concentração 4). Uma vez que os resultados mostraram que tanto a concentração de 0.1 mg/L para o Formaldeído, como a concentração 0.005 mg/L para o Hipoclorito de Sódio eram ainda muito elevadas, foi necessário preparar mais duas concentrações: concentração 5 correspondente a 0.01 mg/L para Formaldeído e 0.0005 mg/L para o SH e concentração 6 correspondente a 0.001 mg/L para o Formaldeído e 0.00005 mg/L para o Hipoclorito de Sódio.

Todo o procedimento, pode ser visto com maior precisão no anexo IV.

3. Resultados e discussão

3.1. 1º Teste – Averiguação de qual o método mais eficaz para a lavagem e individualização dos ovos de *Lymnaea stagnalis*

3.1.1. Padrão temporal e preferência espacial de postura dos ovos

A postura de ovos na espécie *Lymnaea stagnalis* era um ponto fulcral para toda a investigação, uma vez que seria necessário utilizar diversas massas de ovos, sendo necessário colhê-las e usá-las mal fossem colocadas. Assim, a necessidade de tentar compreender qual a altura do dia mais favorável para a oviposição tornou-se uma necessidade.

Por exemplo, em *Danio rerio* é possível saber que a ovulação ocorre normalmente um pouco antes do amanhecer e a desova começa nas primeiras horas de luz do dia, uma vez que o organismo já se encontra intensamente estudado. Esta situação não se verifica em *L. stagnalis*, pois, apesar de nos últimos anos ter começado a ser mais estudada e utilizada como bioindicador, ainda não foi possível estabelecer-se uma relação entre a oviposição e o fotoperíodo.

Durante o primeiro teste realizado nesta tese, procedeu-se a um registo diário de quantas massas de ovos eram encontradas nos três recipientes de vidro e o local onde as mesmas eram depositadas. No final do período do ensaio, os dados obtidos individualmente em cada frasco foram unidos, obtendo-se os resultados que podem ser observados nas figuras 3 e 4.

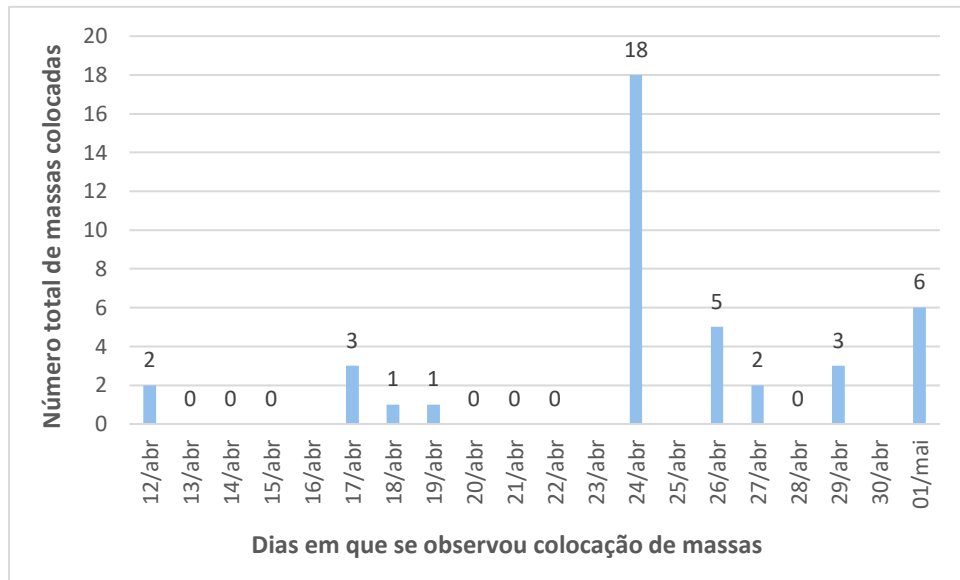


Fig. 3 – Número de massas de ovos total que foi encontrado a cada do ensaio. Nos dias 16 de abril, 23 de abril, 25 de abril e 30 de abril não foram contabilizadas massas por corresponderem a domingo e feriado.

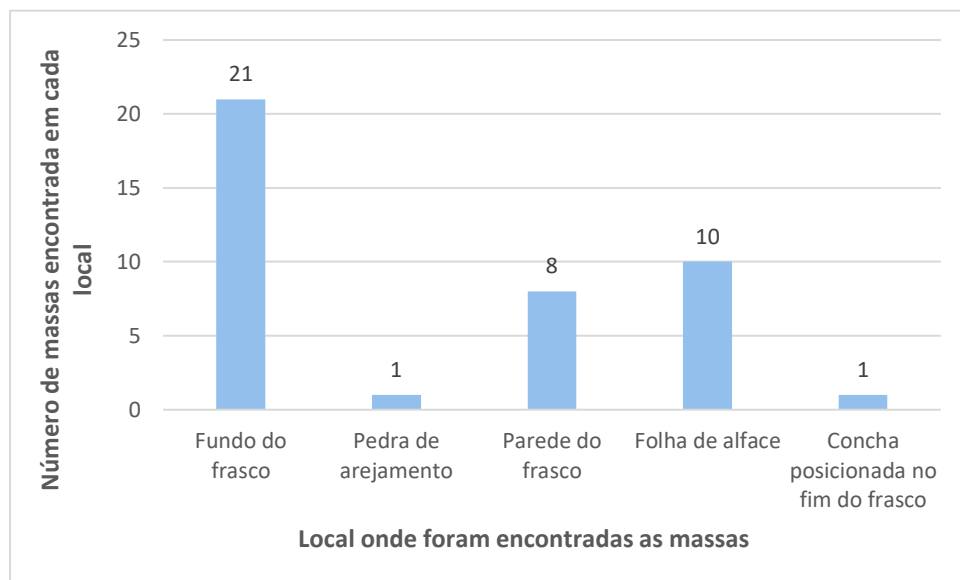


Fig. 4 – Número total de massas de ovos encontradas para cada local onde se verificou deposição das mesmas, durante o primeiro teste.

Examinando a figura 3 é possível verificar que de 12 de abril a 22 de abril, ocorreu uma menor deposição de ovos, num total de apenas 7 ovos nos três frascos. Porém, como de 24 de abril a 1 de maio se obteve um aumento considerável na oviposição (um total de 34 massas), é de considerar a possibilidade de que, de 12 de abril a 22 de abril os indivíduos se encontravam em habituação ao novo habitat, tornando provável que a diminuição da deposição de massas se deva ao stress sentido pelos gastrópodes.

Outro ponto interessante a retirar desta figura, é que, sempre que se procedeu à muda do meio, passados dois dias ocorria deposição de ovos (o meio foi renovado nos dias 15, 18, 22 e 27 de abril). Estes dados podem servir para confirmar a teoria de que a muda do meio estimula a oviposição (Dettlaffn and Vassetzky, 1990).

O dia 24 de abril foi o dia em que se registou maior número de massas de ovos, porém, convém ter em atenção que, uma vez que o dia anterior foi um domingo, não ocorreu verificação dos frascos, logo das 18 massas existentes no dia 24 de abril, algumas podem ter sido colocadas no dia 23 de abril. Contudo, fazendo a média dos ovos conseguidos durante todos os dias da investigação, foi concluído que os caracóis colocaram 2,6 massas de ovos por dia.

Relativamente ao local preferencial para oviposição (figura 4), verificou-se que os indivíduos adultos escolheram cinco locais diferentes: o fundo do recipiente de vidro, a folha de alface que serve como alimento, a parede do frasco de vidro, a pedra responsável pelo arejamento e a concha de bivalve colocada no fundo do frasco de forma a fornecer cálcio aos organismos. É de notar que o fundo do frasco foi o local onde se encontrou mais vezes massas de ovos (das 41 massas contabilizadas durante o ensaio, 21 foram encontradas neste local), seguido da folha de alface (10 massas num total de 41) e da parede do frasco (8 massas num total de 41).

Apesar de se verificar uma maior tendência para as massas serem colocadas no fundo, é necessário ter em atenção que, nem todas as massas lá encontradas podem ter sido, efetivamente, lá depositadas. Algumas das massas podem ter-se soltado do verdadeiro local onde ocorreu a oviposição e, devido ao efeito da gravidade, terem ido parar ao fundo do frasco de vidro, dando um valor diferente do que realmente acontece. Este fato deve-se à impossibilidade de proceder à verificação aquando da postura, já que não se sabe quando é que os indivíduos vão proceder ao ato. Quanto à escolha da folha de alface como segundo local favorito, pode ter haver com a conveniência de os gastrópodes não terem de se deslocar para outro local para se alimentar.

3.1.2. Método de lavagem e individualização dos ovos

A capacidade da espécie *Lymnaea stagnalis* servir como hospedeira para diversos parasitas, leva à necessidade de se prestar um cuidado redobrado aquando da escolha dos indivíduos a empregar nos testes. Da mesma maneira, a presença de outros organismos para além dos gastrópodes na cultura é uma possibilidade, assim, é

indispensável garantir que as massas de ovos selecionadas para integrar o estudo, não permanecem com vestígios de nenhum organismo para além dos embriões da espécie.

Para a primeira tentativa de lavagem, utilizou-se a técnica descrita por Marois and Croll (1991). Estes investigadores lavaram as massas de ovos obtidas nos seus estudos em água corrente durante 15 minutos. Todavia, concluiu-se logo que este não seria o método indicado, uma vez que, as massas ficavam danificadas por muito pouca que fosse a pressão da água que lhes embatia. Este fator invalidava o uso da massa, pois não era possível saber se os ovos que se encontravam dentro da mesma se tornavam inutilizáveis.

A segunda tentativa foi um processo que derivou da técnica usada por Marois and Croll (1991), com algumas alterações: em vez de se posicionar as massas de ovos por baixo de água corrente, utilizou-se três gobelés de 600 ml preenchidos igualmente com água da torneira; em vez de as massas estarem 15 minutos dentro da água, passaram a estar 1 minuto em cada um dos gobelés; uma vez que já não existia nenhuma pressão para levar a que os parasitas deixassem de estar presos à massa, com o auxílio de um pincel, provocou-se um pequeno agitação na água de cada gobelé.

A utilização de água clorada em vez de *Snail Water* deveu-se à presença do cloro, que, como atua como desinfetante, provoca a morte dos parasitas alojados na massa de ovos. A utilização de três gobelés deveu-se ao fato de que, ao colocar as massas no primeiro gobelé e provocando a agitação da água, os parasitas e detritos que se encontram encrustados nas massas sofrem uma separação, ficando retidos na água. Dessa forma é garantido que a massa fica cada vez mais limpa, já que passa para outro gobelé cuja água não se encontra deteriorada. Após verificação com uma lupa binocular, chegou-se à conclusão que este método de lavagem funciona e que não danifica as massas de ovos de nenhuma forma, contando que a agitação provocada pelo pincel não seja demasiado vigorosa.

Como já foi dito anteriormente, existem diversas maneiras para proceder à individualização dos ovos e, como diferentes autores utilizam diferentes métodos, foi necessário estudar qual a melhor forma de isolar os ovos sem que ocorresse mortalidade dos embriões.

Os métodos empregues por Clement (1952), Marois and Croll (1991) e Barsi et al. (2014) consistiram em pressionar a massa até os ovos saírem, friccionar os ovos em papel absorvente, ou extrair os ovos com uma pipeta de Pasteur, respetivamente. Nenhum destes métodos pareceu ser o mais indicado para isolar os ovos, já que apresentam

possibilidade de danificar ou provocar a morte dos embriões. Como tal, o método aplicado por Liu et al. (2003) pareceu ser o mais apropriado. Conforme se foi avançando no processo, tornou-se claro que a alternativa usada por Marois end Croll (1991) apresentava algumas vantagens, nomeadamente ao ajudar a separar a matriz gelatinosa que ficava agarrada ao ovo. Todavia, foram encontrados alguns obstáculos que necessitaram de ser ajustados: a indispensabilidade de manter a massa que se encontra no papel de filtro molhada; a necessidade de usar pinças de ponta arredondada para não arrebentar os ovos; não arrastar em demasia os ovos pelo papel de filtro para não provocar o seu rebentamento; e colocar os ovos que já se encontram isolados numa placa de petri preenchida por *Snail Water*, pois, caso contrário, os ovos secam e arrebentam.

Para se garantir que este método era viável, registou-se diariamente a mortalidade e as eclosões que ocorreram ao longo dos 20 dias de ensaio. Os resultados são apresentados nas figuras 5 e 6.

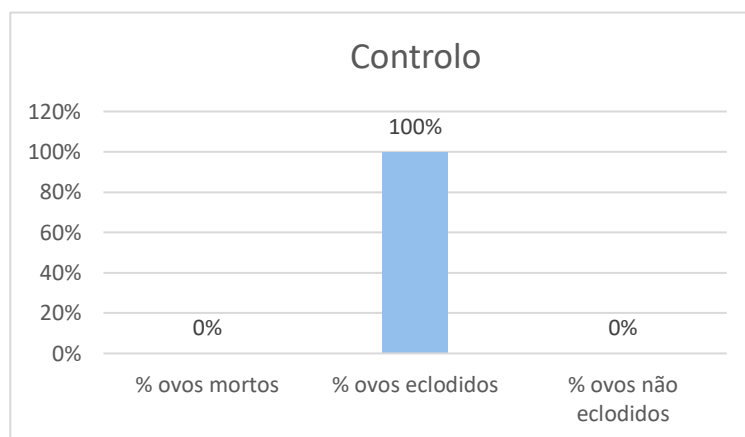


Fig. 5 – Percentagem de mortalidade, eclosão e não eclosão dos ovos que se encontravam dentro da massa de ovos – controlo.

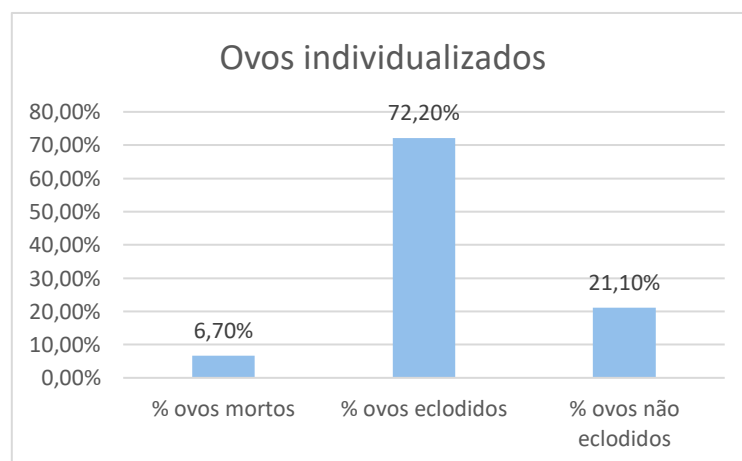


Fig. 6 - Percentagem de mortalidade, eclosão e não eclosão dos ovos que foram isolados.

Tal como esperado, no grupo do controlo (ovos localizados dentro da massa) verificou-se a eclosão total dos embriões, sem ocorrência de nenhuma mortalidade. Por sua vez, no grupo dos ovos isolados, ocorreu uma mortalidade de 6,7% e uma taxa de eclosão de 72,2%.

A taxa de mortalidade comparativamente à taxa de eclosão ocorrida no grupo dos ovos individualizados é relativamente baixa e pode ter sido causada por mau manuseamento dos ovos durante o seu isolamento, por eventuais malformações que tenham ocorrido durante o desenvolvimento embrionário ou pela ausência da matriz gelatinosa, uma vez que é esta que confere proteção e nutrientes aos embriões. Como a mortalidade é de apenas 6,7%, é seguro dizer que a combinação dos métodos de individualização utilizados por Marois and Croll (1991) e Liu et al. (2003) permitiu criar um método de isolamento de ovos viável e adaptados às necessidades dos embriões de *L. stagnalis*.

Por outro lado, a média do tempo de eclosão dos ovos (figura 7), informa-nos que o controlo demora em média mais um dia (17 dias) a eclodir que os ovos isolados (15,7 dias). A presença da matriz gelatinosa pode ser a causa desse retardamento, situação já evidenciada anteriormente por Chaffee and Strathmann (1984), como referido em Marois and Croll (1991). Estes investigadores indicam que as barreiras de proteção da massa dos ovos podem impedir a difusão de substâncias entre os embriões em desenvolvimento e o meio ambiente e, assim, retardar o desenvolvimento, situação que é suportada pelos dados obtidos nesta tese.

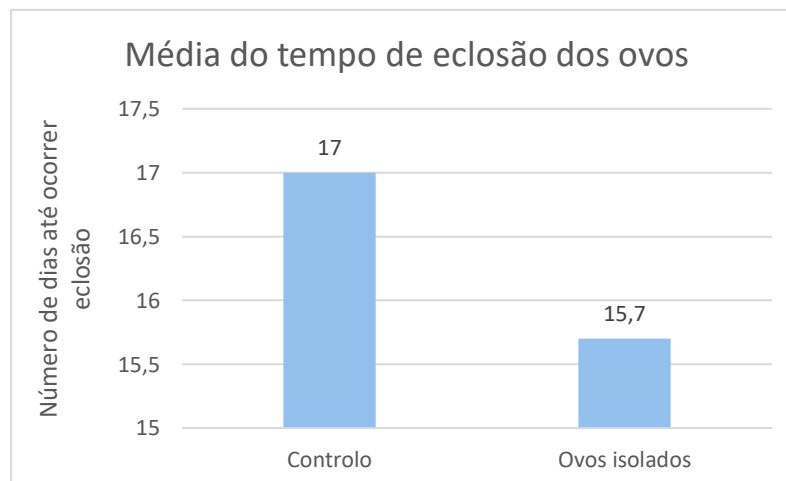


Fig. 7 – Tempo médio que os ovos demoram desde a sua deposição até à sua eclosão.

3.2. 2º Teste - Avaliação do desenvolvimento embrionário de ovos de *Lymnaea stagnalis* na presença ou ausência da massa gelatinosa que confere proteção aos ovos

Resultados obtidos durante o primeiro teste revelaram a possibilidade de ocorrer um atraso na eclosão dos ovos que se encontram dentro da massa de ovos. A necessidade de compreender melhor este fenómeno levou a que fosse considerado realizar um teste mais específico, para fundamentar a hipótese de que a presença da massa de ovos afeta de alguma forma a eclosão dos ovos.

Porém, contrariamente ao esperado, os resultados adquiridos neste teste não foram os necessários para obter qualquer tipo de validação para a hipótese colocada. Apesar de se ter utilizado 98 ovos no total, 60 deles acabaram por morrer, mesmo que tenha sido ao longo dos diferentes dias do ensaio (figura 8). A causa desta mortalidade não é conhecida, contudo suspeita-se que tenha ocorrido algum tipo de contaminação durante alguma parte do processo de lavagem ou individualização.

No controlo não ocorreu mortalidade, porém, também não ocorreu nenhuma eclosão durante todo o ensaio, o que só vem confirmar a possibilidade de ter sido efetuado algum erro durante as primeiras etapas do teste. Já nos ovos individualizados, apesar da alta mortalidade assistida, quando se chegou ao final do teste, existiam alguns ovos com embriões vivos, mas que ainda não tinham eclodido.

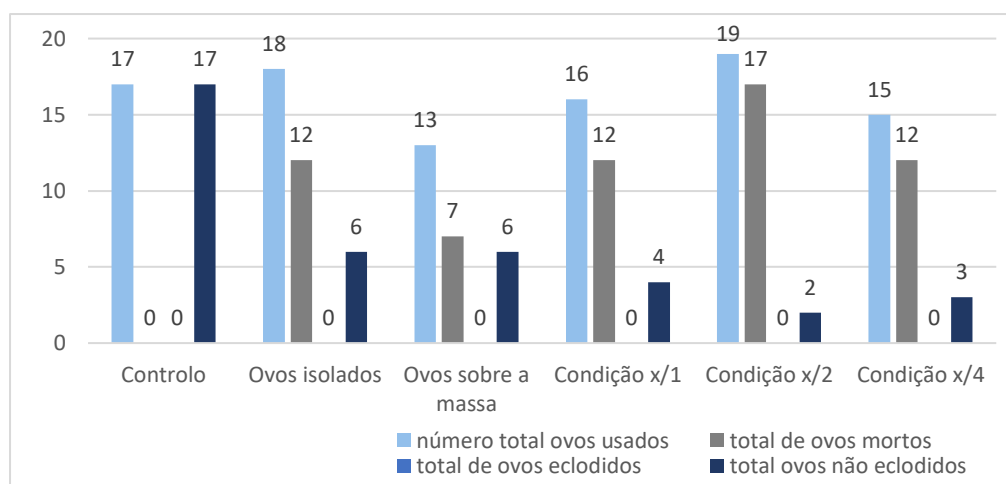


Fig. 8 – Número total de ovos utilizados no ensaio; número total de ovos mortos; número total de ovos que eclodiram e número total de ovos que não eclodiram.

Chaffee and Strathmann (1984), como referido em Marois and Croll (1991), falam na possibilidade de a massa de ovos não permitir a difusão de substâncias entre o meio e

os embriões. Beadle (1969), como referido em Marois and Croll (1991), afirma que a massa diminui a difusão de substâncias com baixo peso molecular e para a difusão de substâncias com grande peso molecular. Estas informações sugerem que o desenvolvimento e a altura em que os embriões eclodem pode ser diferencial, ou seja, dependendo do local onde se encontram posicionados, dentro da massa, alguns embriões podem sofrer um desenvolvimento e eclosão mais rápidos que os restantes – desenvolvimento assíncrono.

Marois and Croll (1991) estudaram esta diferença de desenvolvimento e, consequentemente, da diferença de tempo da taxa de eclosão que os embriões apresentam. Contestaram que os embriões localizados mais na periferia da massa, apresentam um desenvolvimento mais rápido que os que se encontram no meio da massa. Para além disso, os embriões que estejam junto à parede da massa de ovos também apresentam diferenças no tempo de desenvolvimento: mais rápido se a parede da massa estiver em contato com a água e mais lento se a parede da massa estiver em contato com algum tipo de substrato. A justificação para o acontecimento destas situações deve-se ao fato de que os embriões situados nas periferias da massa de ovos, usufruem de menos barreiras relativamente à difusão de substâncias, o que leva a um desenvolvimento e eclosão mais acelerado. Desta maneira, os investigadores conseguiram confirmar que a matriz gelatinosa e a parede da massa de ovos são realmente uma barreira para a difusão, o que leva a concluir que a taxa de desenvolvimento é dependente da difusão de substâncias. Gomot (1998) já tinha relatado a ocorrência de difusão de substâncias quando realizou a sua investigação, onde observou que o Cádmio provocava uma inibição de desenvolvimento muito mais forte nos embriões localizados mais na periferia das massas de ovos, que nos embriões situados no centro da massa de ovos, observações estas que foram também alcançadas por Liu et al. (2013).

Uma vez que não houve eclosão de nenhum ovo, neste estudo não foi possível obter um contraste do tempo de eclosão para o controlo e para os ovos presentes nos diferentes tipos de condição. Porém, durante o primeiro teste, relatou-se que o controlo demora em média, apenas mais um dia a eclodir que os ovos isolados (figura 7). Pegando na informação alcançada por Marois and Croll (1991), esta curta diferença pode ter haver com a forma como foi realizado o controlo. Sempre que se iniciava uma nova tentativa para isolar ovos, a massa recolhida era dividida a meio, sendo que metade dos ovos eram individualizados e a outra metade era guardada como controlo. Uma vez que a massa se encontrava fracionada, o meio (Snail Water), conseguia penetrar nos ovos, mesmo estes estando dentro da massa, o que permitia difusão de

substância. Esta troca pode ter levado a que a eclosão ocorresse mais rápido do que deveria, conduzindo a uma aproximação do tempo de eclosão do controlo e dos ovos individualizados.

Em conclusão este ensaio deveria ser repetido no futuro, uma vez que, apesar de existir uma possibilidade de a presença da massa de ovos e da matriz gelatinosa realmente provocar diferenças nos embriões, não foi possível apurar resultados, já que, mesmo o controlo não funcionou da forma correta para validar o ensaio.

3.2.1. Preferência espacial da postura de ovos

A necessidade de tentar compreender a oviposição levou a que se procedesse a uma avaliação do local preferencial para a desova, durante o primeiro teste. Neste segundo teste decidiu-se repetir a análise de qual o local onde se encontravam mais ovos (figura 9).

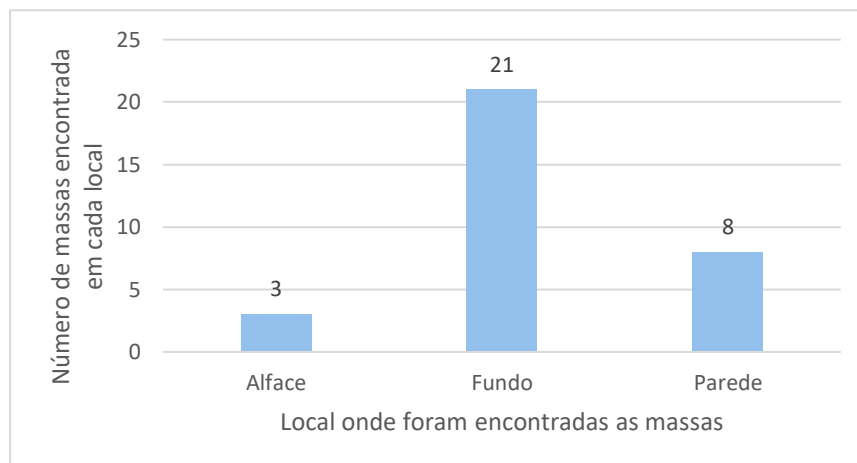


Fig. 9 - Número total de massas de ovos encontradas para cada local onde se verificou deposição das mesmas, durante o segundo teste.

Ficou comprovado que os locais preferenciais durante este teste são os mesmos que foram obtidos durante o primeiro teste, continuando a verificar-se uma maior preferência pelo fundo do frasco de vidro (21 ovos encontrados num total de 32 ovos). Contudo, não se deve excluir a possibilidade de existir um erro relativamente ao verdadeiro número de massas depositadas nesse local, tal como explicado no primeiro teste. Todavia, este teste serve para dar alguma solidez aos resultados obtidos durante o primeiro teste, uma vez que são bastante semelhantes, confirmando a verdadeira possibilidade de os adultos de *Lymnaea stagnalis* elegerem o fundo dos recipientes onde se encontram, como o melhor local a depositar massas de ovos.

3.2.2. Reprodução e fases de desenvolvimento

Geralmente, para se conseguir realizar um estudo, é necessário garantir a continuidade das culturas, o que se traduz na necessidade de ocorrência de oviposição, de forma a ser possível obter novas gerações que sejam capazes de substituir os progenitores mais antigos. Assim, é possível estimular a oviposição, efetuando algumas alterações na manutenção habitual da cultura: se a alimentação não for constante, deve proceder-se a uma alimentação *ad libitum*, uma vez que para além de ser favorável à reprodução, também é favorável para o crescimento; a temperatura da cultura, que normalmente ronda a temperatura ambiente, deve ser aumentada gradualmente para os 25°C - 26°C (Raven and van der Wal, 1964 como referido em Dettlaffn and Vassetzky, 1990); o meio deve manter-se limpo, diminuindo a quantidade de ureia e amónio; o fotoperíodo, que em geral se mantém 12h luz – 12h escuridão, deve ser prolongado para 16h luz – 8h escuridão; e por fim, a densidade de indivíduos deve ser moderada, sendo que basta colocar 3 a 4 animais dentro de um aquário, de forma a ser possível a sua reprodução através de fertilização cruzada.

A utilização de uma lupa com uma ampliação de 50x permitiu seguir todo o desenvolvimento embrionário de forma próxima, tornando-se possível visualizar os diferentes eventos pelos quais passam os embriões, assim como as diferentes fases.

Assim, desde a postura até à eclosão, os embriões passam por diversas alterações, ocorrendo no total quatro fases de desenvolvimento principais (Meshcheryakov, 1990; Lalah et al., 2007; Smirthwaite et al., 2007; Tills et al., 2013):

- **Fase de Mórula** – Aqui os embriões (que apresentam uma coloração amarela) sofrem diversas divisões celulares, passando desde uma célula, para duas células, para quatro células, e assim sucessivamente, até às 64 células. O tempo decorrido entre cada alteração de desenvolvimento é de aproximadamente duas horas. Ainda dentro desta fase, ocorre o que se designa por Gástrula, que corresponde à fase em que os embriões começam a desenvolver uma rotação muito lenta;

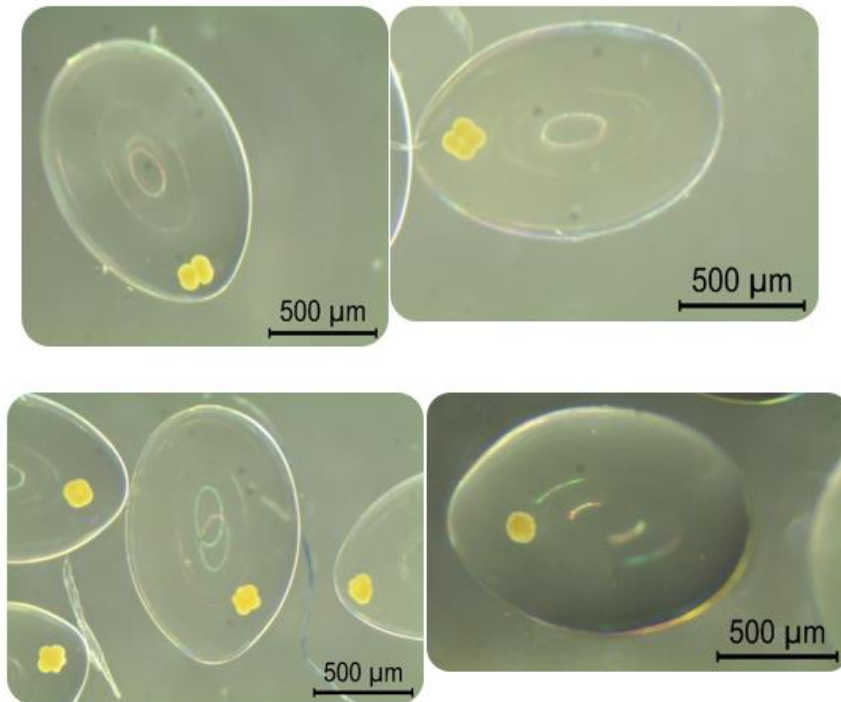


Fig. 10 - Embrião de *Lymnaea stagnalis* durante a fase de desenvolvimento Mórula. Na primeira imagem o embrião apresenta 2 células; na segunda imagem o embrião aparece já com 4 células; na terceira imagem observa-se as 6 células; na última imagem o embrião apresenta múltiplas células. Estas imagens foram observadas e captadas numa ampliação de 50x.

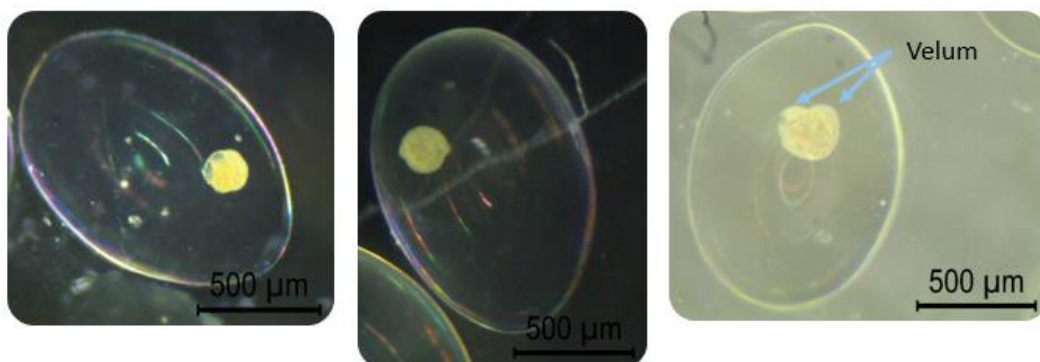


Fig. 11 - Embrião de *Lymnaea stagnalis* durante a fase de desenvolvimento Trocófora. Na primeira imagem é possível observar a alteração da transparência do embrião; a segunda imagem corresponde ao início do aparecimento do Velum; a terceira imagem apresenta o Velum igualmente formado nas duas pontas do embrião. Estas imagens foram observadas e captadas numa ampliação de 50x.

- **Fase de Velígera** – a transição para esta fase ocorre quando é possível observar no embrião dois lóbulos semelhantes em forma e tamanho, onde anteriormente era apresentado o velum, o que acaba por conferir ao embrião a forma característica de meia-lua. Após este desenvolvimento sucede-se a formação da concha, a ocorrência de

batimento cardíaco visível, assim como o aparecimento da pigmentação dos olhos. No final da fase, o embrião apresenta movimento espontâneo do pé.

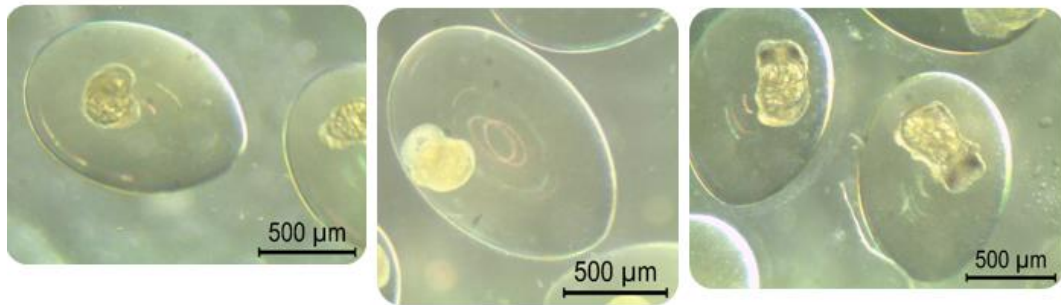


Fig. 12 - Embrião de *Lymnaea stagnalis* durante a fase de desenvolvimento Velígera. Na primeira imagem verifica-se uma diferenciação do Velum na cabeça e pé; na segunda imagem mostra o desenvolvimento da cabeça; na terceira imagem é possível visualizar o a zona onde se desenvolverão os olhos. Estas imagens foram observadas e captadas numa ampliação de 50x.

- **Fase Hippo** – nesta fase final, os caracóis desenvolvem uma cabeça que faz lembrar a cabeça de um hipopótamo, característica essa que confere o nome à fase. Ocorre também o desenvolvimento completo dos olhos, que passam a ter uma coloração negra, assim como o movimento completo do pé, que chega até à concha. Nesta altura, o gastrópode já é capaz de nadar livremente dentro do ovo, proceder à flexão do corpo assim como de puxar a sua concha até à cabeça. A última característica a aparecer é a Rádula, que permite ao gastrópode raspar a membrana do ovo, levando à sua rutura, conduzindo a eclosão do juvenil.

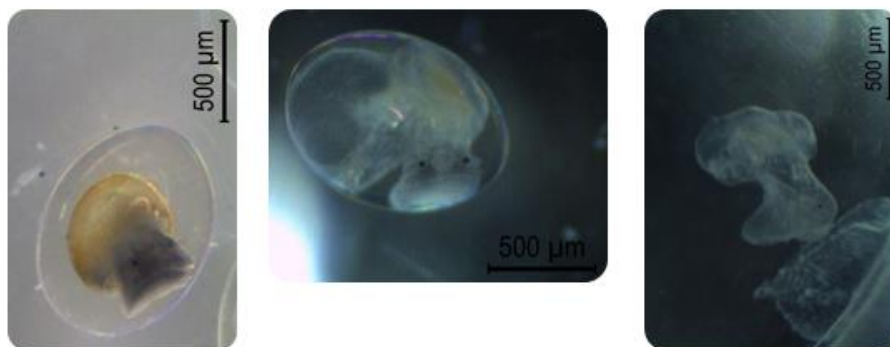


Fig. 13 - Embrião de *Lymnaea stagnalis* durante a fase de desenvolvimento Hipo. Nas primeiras duas imagens é possível observar a característica que dá nome à fase (cara em forma de hipopótamo); a última imagem corresponde à eclosão. Estas imagens foram observadas e captadas numa ampliação de 50x.

No anexo V é possível visualizar uma tabela onde são apresentados todos os eventos embrionários desde que os ovos são colocados até à eclosão segundo Meshcheryakov (1990), Smirthwaite et al. (2007) e Tills et al. (2013) e as observações feitas durante este ensaio.

Por sua vez, no anexo VI, são apresentadas as fotografias completas recolhidas durante a realização desta dissertação, referentes ao desenvolvimento embrionário de *L. stagnalis* até ao momento da sua eclosão. São também apresentadas fotografias de algumas anomalias dos ovos.

3.3. 3º Teste – Teste de toxicidade utilizando 10 compostos tóxicos

Quando o meio aquático se encontra comprometido devido às ações do Homem, torna-se uma necessidade tentar defender a recuperação tanto dos habitats aquáticos, como das espécies que os residem. Uma vez que, as fontes de poluição provêm de substâncias que se encontram em constante uso, torna-se fulcral perceber como e até que ponto estas matérias são incapacitantes quando entram em contato com as espécies aquáticas. Portanto, os testes toxicológicos realizados nesta dissertação são uma tentativa de responder a essas perguntas, para que se possa trabalhar de forma a melhorar os critérios existentes referentes à qualidade da água.

Durante a sua investigação com *R. auricularia* (gastrópode pulmonado da mesma família que *Lymnaea stagnalis* – Lymnaeidae), Liu et al. (2013), testou como os embriões reagiam à presença de Cádmio, quer estivessem isolados, quer estivessem contidos dentro da massa de ovos. Concluiu que a presença da matriz gelatinosa fornece uma proteção aos ovos, limitando a sensibilidade dos embriões à ação do tóxico, tendo obtido mais mortalidades nos ovos individualizados que nos ovos envolvidos pela matriz gelatinosa. Uma vez que, para os testes de toxicidade serem bem-sucedidos é necessário que o químico chegue aos embriões de modo a produzir alterações nestes. Assim, justifica-se a utilização de ovos individualizados em vez de ovos onde está a ser aplicada a ação protetiva da massa de ovos.

Durante todos os ensaios, foram registadas diariamente as mortalidades, até ocorrer eclosão ou até acabar o tempo do teste (20 dias). Para todos os tóxicos foram usados seis embriões individualizados por cada concentração, sendo a única exceção o tóxico Imidacloprida. Uma vez que os resultados desta substância específica eram bastante diferentes dos restantes, efetuou-se uma repetição do teste, para ser possível confirmar os dados adquiridos da primeira vez. Realizados ambos os testes e validados os valores, procedeu-se ao somatório dos resultados, traduzindo-se na utilização de doze embriões em vez de seis.

As mortalidades obtidas foram transformadas em gráficos separados por químico e podem ser consultados seguidamente. No controlo, tal como esperado, não ocorreu nenhuma mortalidade durante todos os dez testes.

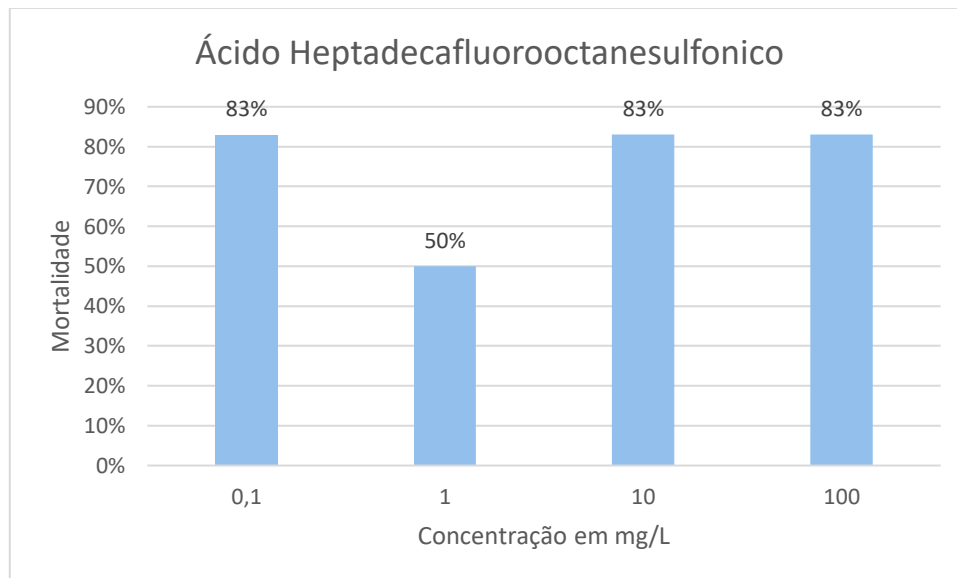


Fig. 14 – Mortalidade obtida para os embriões de *L. stagnalis* perante a utilização do tóxico ácido Heptadecafluorooctanesulfónico, nas diferentes concentrações estudadas.

Na figura 14 é possível observar que a percentagem de mortalidade dos embriões é constante em todas as concentrações estudadas, com exceção da concentração de 1 mg/L, onde ocorreu um decréscimo de 83% para 50%. Estes valores traduzem-se numa diminuição de 5 embriões mortos (num total de 6) – 83%, para apenas 3 embriões mortos (num total de 6) – 50%. Uma vez que a mortalidade é constante nas restantes concentrações, a diferença observada na concentração de 1 mg/L pode ser devido a algum erro do acaso.

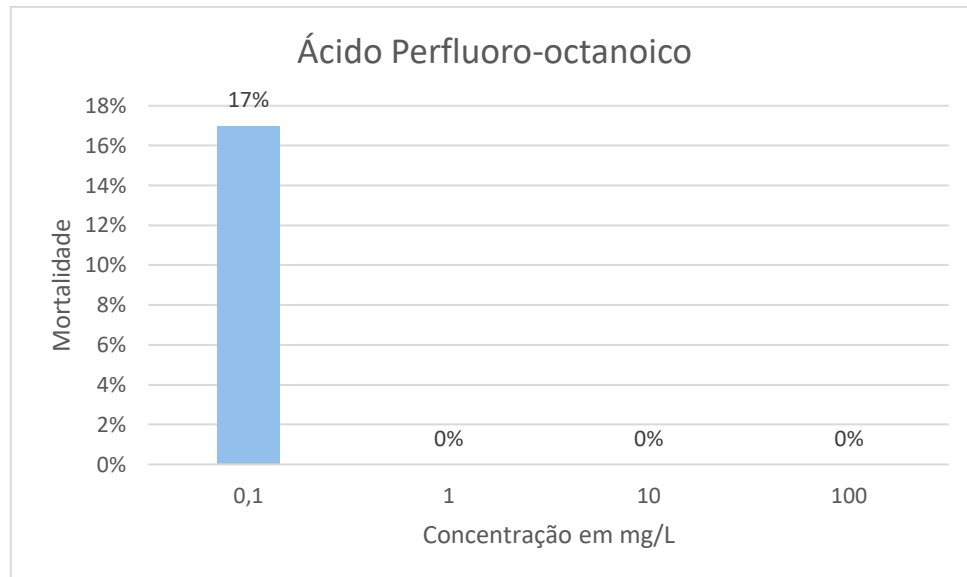


Fig. 15 – Mortalidade obtida para os embriões de *L. stagnalis* perante a utilização do tóxico ácido Perfluoro-octanoico, nas diferentes concentrações estudadas.

Relativamente ao ácido Perfluoro-octanoico (figura 15), apenas ocorreu a mortalidade de 1 embrião na concentração de 0,1 mg/L. Como não ocorreu nenhuma mortalidade em mais nenhuma concentração, pode atribuir-se a única mortalidade a erro do acaso. Uma vez que a OCDE (2014) impõe como limite máximo a concentração de 100 mg/L e não foi observada nenhuma mortalidade, pode indicar que os embriões de *Lymnaea stagnalis* não são sensíveis à ação deste químico.

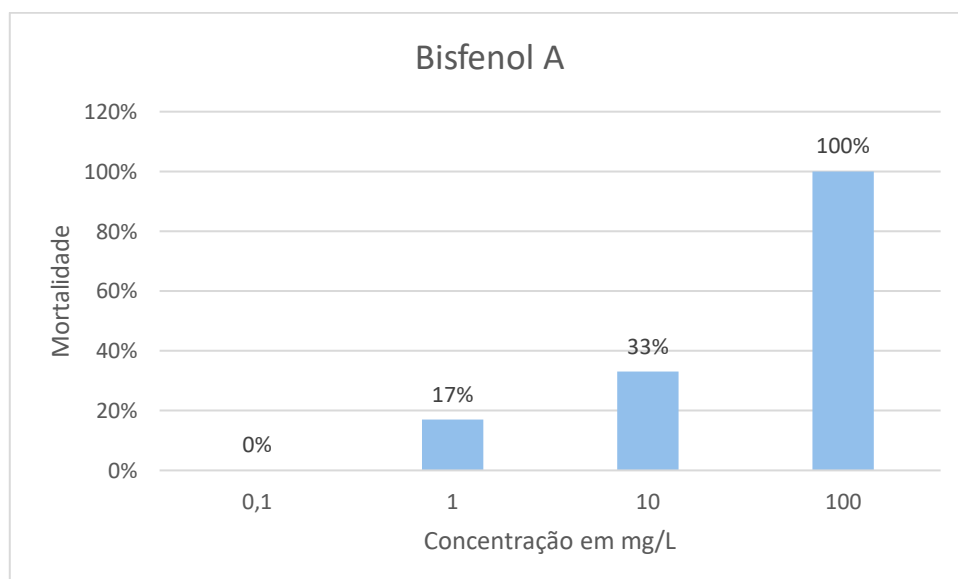


Fig. 16 – Mortalidade obtida para os embriões de *L. stagnalis* perante a utilização do tóxico Bisfenol A, nas diferentes concentrações estudadas.

O estudo realizado com o tóxico Bisfenol A mostra que ocorre uma diminuição da mortalidade consoante se diminuiu a concentração utilizada, ou seja, na concentração

mais alta (100 mg/L) obteve-se uma mortalidade de 100%, que diminuiu até 0% na concentração mais baixa (0,1 mg/L). Este resultado indica que a espécie utilizada é sensível ao Bisfenol A.

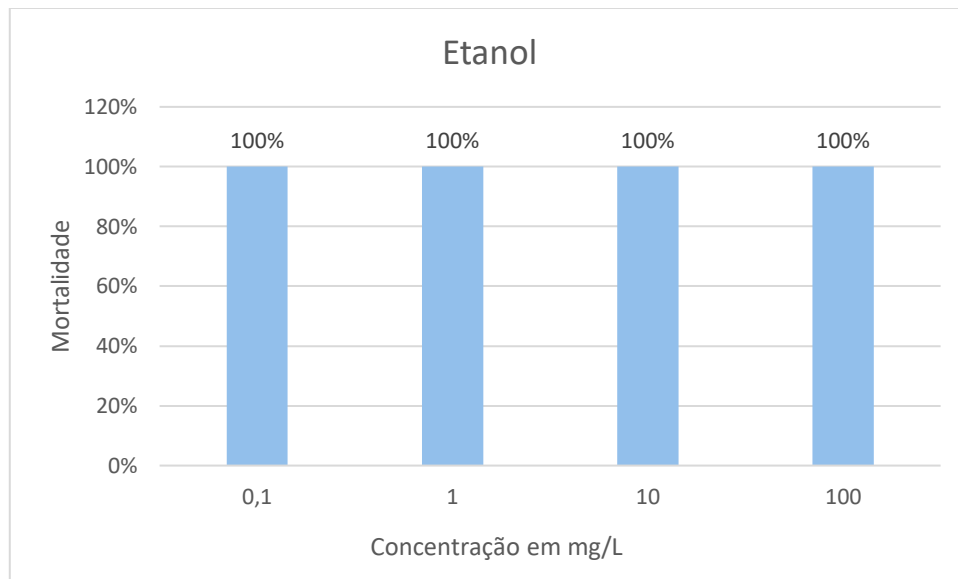


Fig. 17 – Mortalidade obtida para os embriões de *L. stagnalis* perante a utilização do tóxico Etanol, nas diferentes concentrações estudadas.

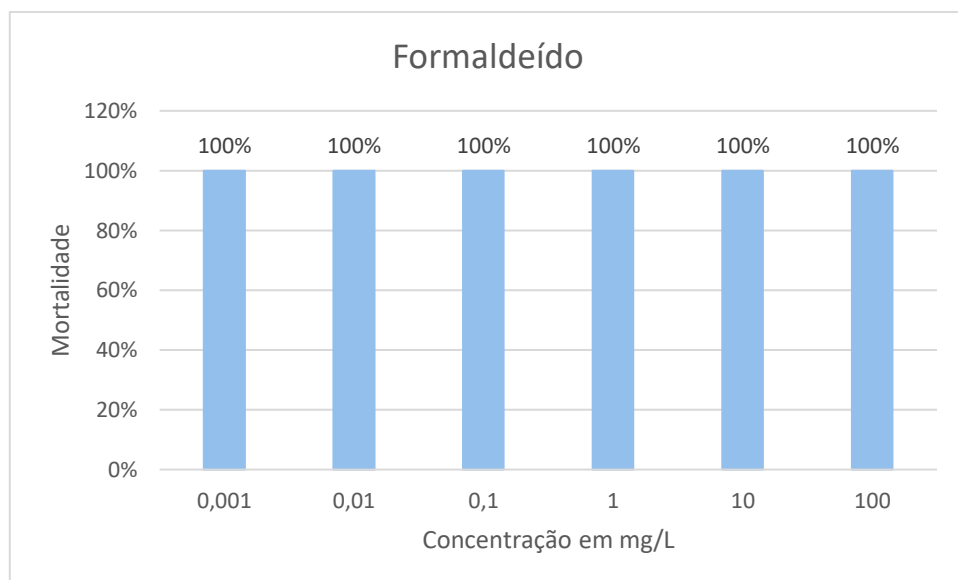


Fig. 18 – Mortalidade obtida para os embriões de *L. stagnalis* perante a utilização do tóxico Formaldeído, nas diferentes concentrações estudadas.

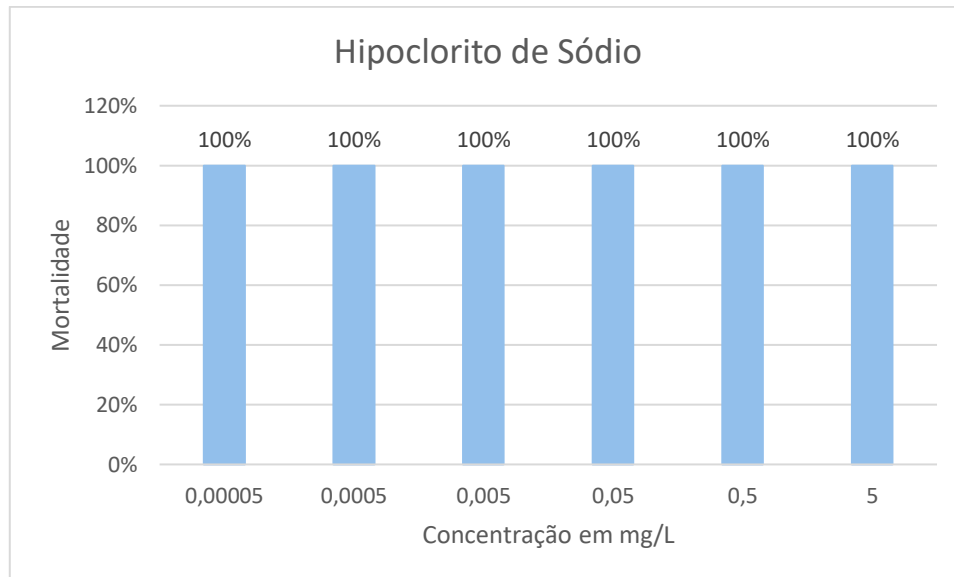


Fig. 19 – Mortalidade obtida para os embriões de *L. stagnalis* perante a utilização do tóxico Hipoclorito de Sódio, nas diferentes concentrações estudadas.

As figuras 17, 18 e 19 dizem respeito aos resultados encontrados após a realização dos testes toxicológicos utilizando os tóxicos Etanol, Formaldeído e Hipoclorito de Sódio, respetivamente. É possível verificar que a mortalidade obtida foi igual nos três testes e em todas as concentrações, isto é, 100% mortalidade. Os dados encontrados revelam que os embriões de *L. stagnalis* são demasiados sensíveis às substâncias, mesmo na concentração mais baixa estudada (0,1 mg/L).

Relativamente aos tóxicos Hipoclorito de Sódio e Formaldeído, quando se realizou os testes verificou-se que os embriões colocados na concentração de 100 mg/L apresentavam uma mortalidade quase imediata e que a mortalidade nas restantes concentrações ocorreu entre um dia no máximo dois após o início dos testes. Este acontecimento indicou que as concentrações utilizadas eram demasiado exageradas para a espécie, logo, foi decidido testar mais duas concentrações para além das testadas em todos os testes: 0,0005 e 0,00005 mg/L para o Hipoclorito de Sódio e 0,01 e 0,001 mg/L para o Formaldeído.

A diluição extra das concentrações do Hipoclorito de Sódio e do Formaldeído foi uma tentativa de verificar se ocorria alguma diferença na mortalidade, porém os resultados obtidos revelaram que mesmo assim, as concentrações são demasiado altas para a sensibilidade destes gastrópodes, tendo-se obtido, novamente, uma taxa de mortalidade de 100% (figuras 18 e 19).

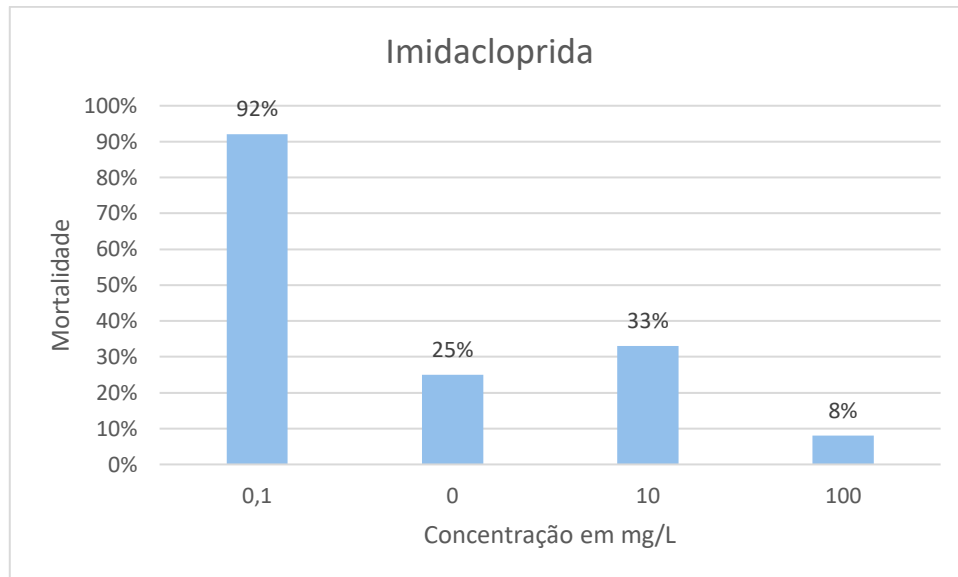


Fig. 20 – Mortalidade obtida para os embriões de *L. stagnalis* perante a utilização do tóxico Imidacloprida, nas diferentes concentrações estudadas.

Um dos químicos que mais surpreende é o Imidacloprida, uma vez que, analisando a figura 20, é possível detetar que conforme diminuiu a concentração aplicada nos testes com os embriões, maiores é a mortalidade encontrada. Este acontecimento indica que o modo como esta substância tóxica afeta os embriões de *L. stagnalis* é diferente do modo como os restantes afetam os embriões, já que apenas com o Imidacloprida é que se verificou resultados deste género.

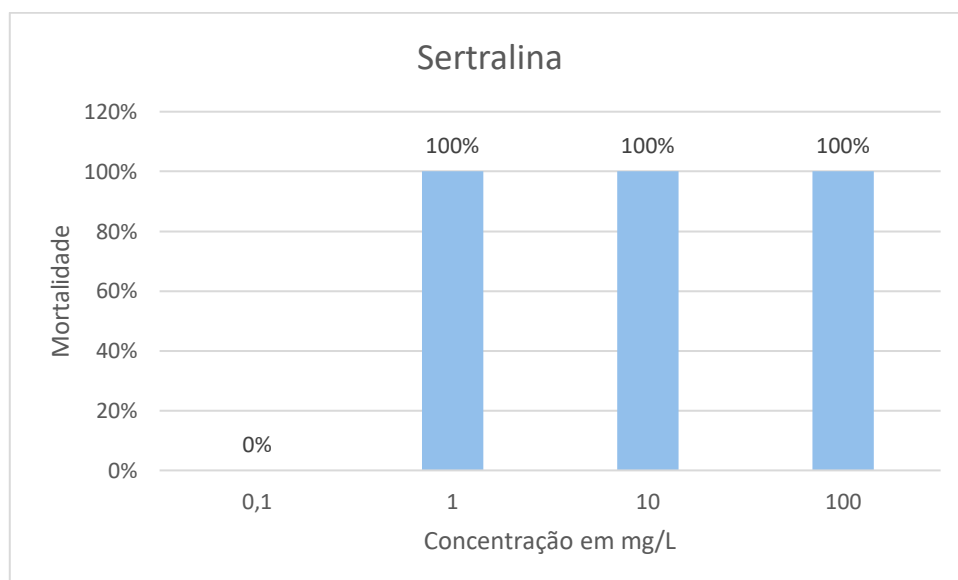


Fig. 21 – Mortalidade obtida para os embriões de *L. stagnalis* perante a utilização do tóxico Sertralina, nas diferentes concentrações estudadas.

O tóxico Sertralina (figura 21) apresenta 100% de mortalidade nas três concentrações mais altas (100, 10 e 1 mg/L), porém, quando se coloca os embriões na concentração de 0,1 mg/L, não se verifica nenhuma mortalidade. Estes resultados informam que os

embriões são sensíveis ao químico, mas que a partir de 1 mg/L, este torna-se demasiado tóxico.

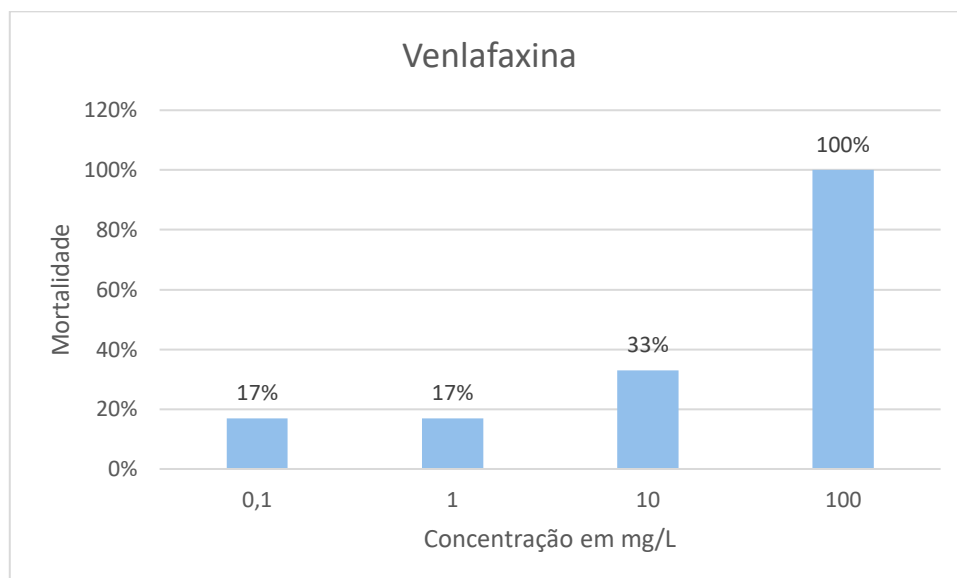


Fig. 22 – Mortalidade obtida para os embriões de *L. stagnalis* perante a utilização do tóxico Venlafaxina, nas diferentes concentrações estudadas.

A figura 22 apresenta os resultados adquiridos no teste com o tóxico Venlafaxina. Os dados são bastante semelhantes aos obtidos no teste com o químico Bisfenol A, sendo que conforme a concentração diminui, também a mortalidade diminui. Desta forma é possível afirmar que a espécie *L. stagnalis* é sensível ao tóxico Venlafaxina.

Por fim, o teste toxicológico realizado com a substância tóxica Tiaclopride indica que os embriões não são sensíveis ao efeito provocado por este químico, uma vez que, desde a concentração de 100 mg/L até à concentração de 0,1 mg/L, não se verificou nenhuma mortalidade.

3.3.1. Valores de LC50

O LC50 diz respeito à concentração letal mediana, ou seja, a concentração letal para 50% dos indivíduos aos quais foi administrado um produto tóxico e foi um dos objetivos pensados quando se decidiu realizar os testes de toxicidade. Era do máximo interesse conseguir-se obter esse valor para todos os testes, contudo, conforme os resultados dos testes toxicológicos foram surgindo, concluiu-se que não seria possível calcular o LC50 para a maior parte das substâncias tóxicas.

O Etanol, o Hipoclorito de Sódio e o Formaldeído foram três tóxicos onde se obteve 100% de mortalidade em todas as concentrações, o que incapacita o cálculo do LC50, que estaria compreendido entre 0 mg/L e 0,1 mg/L para o Etanol, entre 0 mg/L e 0,001

mg/L para o Formaldeído e entre 0 mg/L e 0,00005 mg/L para o Hipoclorito de Sódio. Opostamente, como no Tiaclopride não ocorreu nenhuma mortalidade em nenhuma concentração, o valor de LC50 será superior a 100 mg/L. O ácido Perfluoro-octanoico apresentou apenas 1 embrião morto numa única concentração, que como pode ser considerado um erro do acaso, não permite o cálculo do LC50, sendo o valor superior a 100 mg/L. Quanto ao ácido Heptadecafluorooctanesulfonico, a mortalidade apenas difere na concentração 1 mg/L, sendo inferior à das outras concentrações, que se mantêm com uma mortalidade igual em todas, o que se traduz em um LC50 inferior a 0,1 mg/L. O Imidacloprida é o único químico que não permite o cálculo de LC50 porque os valores de mortalidade obtidos demonstram que este provoca um efeito diferente dos restantes tóxicos. O Sertralina não apresentou nenhuma mortalidade na concentração mais baixa, porém em todas as restantes observou-se que era 100% letal, logo o LC50 estará entre 0,1 mg/L e 1 mg/L.

Efetivamente, os únicos tóxicos que permitiram realizar o cálculo de LC50 foram o Venlafaxina e o Bisfenol A, uma vez que apresentaram bastantes diferenças no número de embriões mortos ao longo das diversas concentrações testadas. Para o Venlafaxina o LC10 48h, LC20 48h e LC50 48h correspondem a 0,192 mg/L, 0,644 mg/L e 6,512 mg/L respetivamente, já o Bisfenol A apresenta um LC10 48h de 1,15 mg/L, um LC20 48h de 2,348 mg/L e um LC50 48h de 9,194 mg/L (Figura 23).

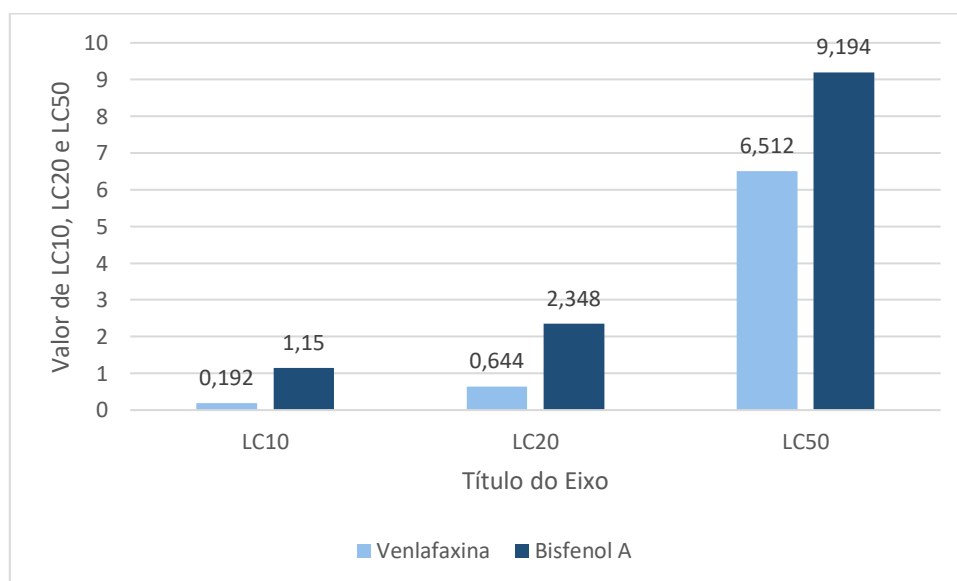


Fig. 23 – Valores de LC10, LC20 e LC50 48h obtidos para os tóxicos Venlafaxina e Bisfenol A para a espécie *L. stagnalis*.

Tabela 2 – Comparação entre os valores de LC50 48h para *Daphnia magna* encontrados na literatura e os valores de LC50 48h para *Lymnaea stagnalis* obtidos nos testes desta dissertação.

Químico	LC50 para <i>Daphnia</i>	48h Referência para <i>Daphnia</i>	LC50 48h para <i>Lymnaea stagnalis</i>
Ácido Heptadecafluorooctanesulfónico	112 mg/L	Li (2009)	< 0,1 mg/L
Ácido Perfluoro-octanoico	201,9 mg/L	Yang et al. (2014)	> 100 mg/L
Imidacloprida	97 mg/L	Loureiro et al. (2010)	-
Tiaclopride	88 mg/L	Loureiro et al. (2010)	> 100 mg/L
Venlafaxina	141,3 mg/L	Minguez et al. (2014)	6,512 mg/L
Sertralina	1,2 mg/L	Minguez et al. (2014)	Entre 0,1 mg/L e 1 mg/L
Formaldeído	29 mg/L	Janssen and Persoone (1993)	Entre 0,001 mg/L e 0 mg/L
Hipoclorito de Sódio	0,04 mg/L	Villegas-Navarro et al. (1997)	Entre 0,00005 mg/L e 0 mg/L
Bisfenol A	12,8 mg/L	Hirano et al. (2004)	9,194 mg/L
Etanol	10479,5 mg/L	Genoni (1997)	Entre 0,1 mg/L e 0 mg/L

Comparando os valores de LC50 48h destes gastrópodes com os valores de LC50 48h para *Daphnia magna* encontrados na literatura (tabela 2) pode-se concluir que:

- *Lymnaea stagnalis* é mais sensível que *Daphnia magna* à ação dos tóxicos ácido Heptadecafluorooctanesulfónico, Bisfenol A, Etanol, Formaldeído, Hipoclorito de Sódio e Venlafaxina, uma vez que os seus valores de LC50 são bastante mais inferiores que os valores encontrados para *Daphnia*;

- *Daphnia magna* é mais sensível que *L. stagnalis* ao químico Tiaclopride, uma vez que o seu valor de LC50 48h é 88 mg/L e o do gastrópode é superior a 100 mg/L;
- Apesar de os valores de LC50 48h para *Lymnaea stagnalis* dos tóxicos ácido Perfluorooctanoico e Sertralina não poderem ser calculados com maior rigor, é possível afirmar que os LC50 48h para *Daphnia* enquadram-se nos intervalos de valores onde o LC50 48h para *L. stagnalis* pode estar inserido, o que leva a querer que a sensibilidade de ambos os organismos é semelhante;
- Uma vez que o Imidacloprida não permitiu o cálculo nem do LC50 48h para *Lymnaea stagnalis*, nem o cálculo de intervalos de valores onde o LC50 pode estar inserido, não é possível saber se é mais sensível ao tóxico que a *Daphnia magna*.

4. Conclusão

A água é um bem essencial para a sobrevivência do Planeta Terra, do Homem e das restantes espécies que nele habitam. A vasta procura por este recurso, o aumento da poluição, o aquecimento global e a diminuição abrupta das fontes de água doce devido ao crescimento exponencial da população, leva a que a humanidade exerça uma grande pressão no meio aquático, o que provoca danos na sua qualidade, que tem vindo a degradar-se como consequência. Para além disso, o Homem ainda produz diariamente inúmeras substâncias que acabam por atingir o meio aquático e danificar negativamente os organismos que nele se encontram. A preservação da água e dos meios aquáticos torna-se assim uma preocupação que deve ser mantida a nível global, uma vez que todos necessitam de contribuir de forma sustentável.

Assim, o grande foco desta dissertação foi a avaliação do efeito provocado por dez substâncias tóxicas (Ácido Heptadecafluorooctanesulfónico, Ácido Perfluoro-octanoico, Bisfenol A, Etanol, Formaldeído, Hipoclorito de Sódio, Imidacloprida, Sertralina, Tiaclopride e Venlafaxina) no gastrópode aquático *Lymnaea stagnalis*, de forma a verificar se este era um bom modelo experimental.

Terminada a investigação pode concluir-se que:

- O método empregue para lavar as massas de ovos (Marois and Croll, 1991) e individualizar os ovos (Liu et al., 2003; Marois and Croll, 1991) demonstram ser eficazes, uma vez que, após a lavagem, as massas apresentavam-se livres de parasitas e após a individualização dos ovos, a taxa de mortalidade é baixa;
- Não foi possível obter com exatidão qual o padrão temporal e preferência espacial de postura dos ovos, porém estima-se que o local preferido para a oviposição é o fundo do aquário;
- O teste em que se efetuou uma avaliação do desenvolvimento embrionário de ovos de *Lymnaea stagnalis* na presença ou ausência da massa gelatinosa, não providenciou resultados conclusivos, uma vez que ocorreu um comportamento irregular no controlo. Porém o fator de proteção encontra-se descrito por diferentes autores que observaram um atraso no desenvolvimento de embriões que estavam envolvidos na matriz gelatinosa. É ainda de referir que alguns autores observaram um desenvolvimento assíncrono dos embriões que se encontravam protegidos pela massa de ovos;
- As fases de desenvolvimento são quatro: Mórula, caracterizada por um embrião redondo de coloração amarela, que se divide em duas, quatro, seis células até às 64

células; Trocófora, onde é possível ver o começo do movimento de rotação, um aumento da transparência do embrião e o aparecimento de uma membrana em pontas opostas do embrião, designada por Velum; Velígera, que é quando o gastrópode começa a desenvolver a cabeça e o pé, aparecendo mais tarde a concha, batimento cardíaco e pigmentação dos olhos; Hippo, sendo possível ver o caracol completamente formado, com uma cabeça que faz lembrar a cabeça de um hipopótamo, olhos e a rádula;

- Os resultados obtidos após os testes toxicológicos demonstraram que o ácido Heptadecafluorooctanesulfónico, o Bisfenol A, o Etanol, o Formaldeído e o Hipoclorito de Sódio são bastantes tóxicos para os embriões de *Lymnaea stagnalis*. O Tiaclopride, pelo contrário, não afetou nenhum embrião em nenhuma concentração, o que indica que estes gastrópodes não são indicados para avaliar os efeitos deste químico. O Imidacloprida apresentou uma mortalidade maior na concentração mais baixa e uma mortalidade menor nas concentrações mais altas, o que significa que atua de forma diferente das restantes substâncias químicas. O ácido Perfluoro-octanoico e o Sertralina demonstram que os valores de LC50 48h do gastrópode são semelhantes aos valores de LC50 48h de *Daphnia*, o que indica uma sensibilidade semelhante;

- Os únicos valores de LC50 48h para *L. stagnalis* calculados com exatidão foram os dos tóxicos Bisfenol A (LC50 48h de 9,194 mg/L) e Venlafaxina (LC50 48h de 6,512 mg/L).

Assim, é possível concluir que os embriões de *L. stagnalis*, na sua maioria, são mais sensíveis aos químicos que *Daphnia magna*, o que significa que os organismos estudados têm uma sensibilidade alta, o suficiente para serem utilizados em testes de toxicidade.

5. Referências Bibliográficas

- Amorim, J. (2014). Avaliação do espectro de reação de um sistema de diagnóstico por vídeo rastreio de Peixes Zebra (*Danio rerio*) expostos a cinco tóxicos distintos. Tese de Mestrado em Toxicologia e Contaminação Ambientais. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto. Porto. 79 pp.
- Anderson et al. (2015). Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: a literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects. *Science of the Total Environment*, nº 505, pp.409-422.
- Aselage. (2011). Exposure Routes of Copper and their Effects on the Great Pond Snail (*Lymnaea stagnalis*). Doctoral dissertation in Natural Resources and Environment. University of Michigan.
- Atli and Grosell. (2016). Characterization and response of antioxidant systems in the tissues of the freshwater pond snail (*Lymnaea stagnalis*) during acute copper exposure. *Aquatic Toxicology* 176, 38–44.
- ATSDR. (2018). Toxicological Profile for Perfluoroalkyls. U. S. Department of Health and Human Services. The Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp200.pdf>
- Azevedo-Pereira, et al. (2011). Effects of imidaclopride exposure on *Chironomus riparius* Meigen larvae: Linking acetylcholinesterase activity to behaviour. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* Nº 74, pp.1210–1215.
- Azizullah et al. (2011). Water pollution in Pakistan and its impact on public health. *Environment International* 37, 479-497.
- Bandelow et al. (2004). Sertraline versus paroxetine in the treatment of panic disorder: an acute, double-blind noninferiority comparison. *The Journal of clinical psychiatry*, 65(3), 405-413.
- Bandow and Weltje. (2012). Development of an embryo toxicity test with the pond snail *Lymnaea stagnalis* using the model substance tributyltin and common solvents. *Science of the Total Environment* 435:90-95.

- Barsi et al. (2014). Considerations for test design to accommodate energy-budget models in ecotoxicology: A case study for acetone in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(7), 1466-1475.
- Borcherding and Jantz. (1997). Valve movement response of the mussel *Dreissena polymorpha* -- the influence of pH and turbidity on the acute toxicity of pentachlorophenol under laboratory and field conditions. *Ecotoxicology*, 6(3), 153-165.
- Borcherding, J. (1994). The " Dreissena-Monitor" - Improved evaluation of dynamic limits for the establishment of alarm-thresholds during toxicity tests and for continuous water control. Lewis publishers, Boca raton, FI(USA)., 477-484.
- Brix et al. (2012). Investigations into the mechanism of lead toxicity to the freshwater pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis*. *Aquatic Toxicology* 106–107, 147–156.
- Brady et al. (2000). Efficacy and safety of sertraline treatment of posttraumatic stress disorder: a randomized controlled trial. *Jama*, 283(14), 1837-1844.
- Brady et al. (1995). Sertraline treatment of comorbid posttraumatic stress disorder and alcohol dependence. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 56(11), 502-505.
- Carr. (2000). Re-use of Process Water in the Food and Beverage Industries, November 17, 2000. Pretoria, South Africa
- CDC. 2018. Fourth national report on human exposure to environmental chemicals. Updated Tables, March 2018. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, Department of Health and Human Services. https://www.cdc.gov/exposurereport/pdf/FourthReport_UpdatedTables_Volume1_Mar2018.pdf.
- Chapman. (2002). Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin* 44 (1), 7-15.
- Chavan et al. (2016). Amino thiophene Carboxylates as Effective Molluscicidal Agents against Fresh Water Pond Snail *Lymnaea stagnalis* in Maharashtra, India. *J. Pharm. Chem. Biol. Sci.*, 4(2), pp.208-217.
- Clasen and Edmondson. (2006). Sodium dichloroisocyanurate (NaDCC) tablets as an alternative to sodium hypochlorite for the routine treatment of drinking water at the household level. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 209, 173-181.

- Clement (1952). Experimental studies on germinal localization in Ilyanassa. I. The role of the polar lobe in determination of the clavage pattern and its influence in later development. J. Exp. Zool, 121:593-625.
- Clerc et al. (1994). A double-blind comparison of venlafaxine and fluoxetine in patients hospitalized for major depression and melancholia. International Clinical Psychopharmacology.
- Coeurdassier et al. (2004). Effects of Cadmium on the Survival of Three Life-Stages of the Freshwater Pulmonate *Lymnaea stagnalis* (Mollusca: Gastropoda). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 72:1083–1090.
- Collins et al. (2009). Water resources across Europe confronting water scarcity and drought. In: European Environmental Agency EEA Report series. N. 2/2009. EEA, Copenhagen, ISSN 1725-9177.
- Coutellec et al. (2008). Effects of the mixture of diquat and a nonylphenol polyethoxylate adjuvante on fecundity and progeny early performances of the pond snail *Lymnaea stagnalis* in laboratory bioassays and microcosms. Chemosphere 73, 326–336.
- Croteau et al. (2014). Bioaccumulation and Toxicity of CuO Nanoparticles by a Freshwater Invertebrate after Waterborne and Dietborne Exposures. Environ. Sci. Technol. 2014, 48, 10929–10937.
- Das and Khangarot. (2011). Bioaccumulation of copper and toxic effects on feeding, growth, fecundity and development of pond snail *Lymnaea luteola* L. Journal of Hazardous Materials, 185(1), 295–305.
- De Schampelaere et al. (2008). Reduction of growth and haemolymph Ca levels in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* chronically exposed to cobalt. Ecotoxicol. Environ. Saf. 71, 65–70.
- Decreto-Lei n.º 55/2011 de 14 de abril. Diário da República N.º 74 – I série, pp. 2307-2310. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa. Disponível em: <https://dre.pt/application/conteudo/276798>
- Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de agosto. Diário da República no 176 – I série A, pp. 3676-3722. Ministério do Ambiente. Lisboa. Disponível em: <https://dre.pt/application/conteudo/430457>

- Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto. Diário da República no 164 – I série, pp. 5747-5765. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Lisboa. Disponível em: <https://dre.pt/application/conteudo/640931>
- Dettlaff and Vassetzky (1990). Animal Species for Developmental Studies: Volume 1 Invertebrates. (Chapter 5 – The Common Pond Snail *Lymnaea stagnalis*). Institute of Developmental Biology Academy of Sciences of the USSR Moscow, USSR. ISBN-13 :978-1-4612-7839-9
- Diderich, J. (2003). Crise de água vai se agravar com diminuição de reservas- ONU. Reuters. Paris.
- Directiva n.º 2011/8/EU de 28 de janeiro. Jornal Oficial da União Europeia. Disponível em: http://publications.europa.eu/resource/ellar/cab230a2-7299-43f8-bbcf-3f98cb291147.0014.02/DOC_1
- Dobrowolski. (1976). Embryological Aspects of Environmental Toxicology Environmental Quality and Safety, vol. 5. Academic Press, New York, pp. 8–81.
- Ducrot et al. (2014). Development and validation of an OECD reproductive toxicity test guideline with the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Mollusca, Gastropoda). Regulatory Toxicology and Pharmacology, 70(3), 605-614.
- Dutra et al. (2009). Carbofuran-induced alterations in the energy metabolism and reproductive behaviors of *Hyalella castroi* (Crustacea, Amphipoda). Comp. Biochem. Physiol. Part C n.º149, pp.640–646.
- ECHA. (2016). Consultado em junho 20, 2018 em: <https://echa.europa.eu/pt/substance-information/-/substanceinfo/100.001.133>
- ECHA. (2017). Consultado em maio 22, 2018 em: <https://echa.europa.eu/information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/details/86244>
- Elia et al. (2006). Hepatic antioxidant enzymes and total glutathione of *Cyprinus carpio* exposed to three disinfectants, chlorine dioxide, sodium hypochlorite and peracetic acid, for superficial water potabilization. Chemosphere 64 (10), 1633-1641.
- Emmanuel et al. (2004). Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. Environment International 30 (7), 891-900.

- Entsuah et al. (2001). Response and remission rates in different subpopulations with major depressive disorder administered venlafaxine, selective serotonin reuptake inhibitors, or placebo. *The Journal of clinical psychiatry*.
- Esch et al. (2002). The transmission of digenetic trematodes: style, elegance, complexity. *Integrative and Comparative Biology* 42, pp.304–312.
- Esch et al. (2001). A perspective on the ecology of trematode communities in snails. *Parasitology* 123, S57–S75.
- Fabre et al. (1995). Sertraline safety and efficacy in major depression: a double-blind fixed-dose comparison with placebo. *Biological psychiatry*, 38(9), 592-602.
- Fernandes. (2014). Evaluation Over Time of the Detection Capability of a Video-tracking System Through Daily Exposure of *Danio rerio* to Sodium Hypochlorite, Ethanol or Bisphenol A. Tese de Mestrado em Toxicologia e Contaminação Ambientais. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto. Porto. 93 pp.
- Fidder. (2015). The toxicological effects of pyraclostrobin on the energy allocation pattern of the freshwater gastropod, *Lymnaea stagnalis*. Doctoral dissertation in Environmental Toxicology. Graduate Faculty of Texas Tech University.
- Fong and Hoy. (2012). Antidepressants (venlafaxine and citalopram) cause foot detachment from the substrate in freshwater snails at environmentally relevant concentrations. *Marine and freshwater behaviour and physiology*, vol.45, nº2, pp.145-153.
- Genoni (1997). Influence of the energy relationships of organic compounds on toxicity to the Cladoceran *Daphnia magna* and the fish *Pimephales promelas*. *Ecotoxicol Environ Saf* 36:27–37
- Gomot, A. (1998). Toxic effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41(3), 288–297.
- Glassman et al. (2002). Sertraline treatment of major depression in patients with acute MI or unstable angina. *Jama*, 288(6), 701-709.
- Greist et al. (1995). Double-blind parallel comparison of three dosages of sertraline and placebo in outpatients with obsessive-compulsive disorder. *Archives of General Psychiatry*, 52(4), 289-295.

- Grosell and Brix. (2009). High net calcium uptake explains the hypersensitivity of the freshwater pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis*, to chronic lead exposure. *Aquatic Toxicology* 91, 302–311.
- Grosell et al. (2006). Chronic toxicity of lead to three freshwater invertebrates — *Brachionus calyciflorus*, *Chironomus tentans*, and *Lymnaea stagnalis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 25 (1), 97–104.
- Hallett et al. (2016). Developmental toxicity of metaldehyde in the embryos of *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda: Pulmonata) co-exposed to the synergist piperonyl butoxide. *Science of the Total Environment* 543, 37–43
- Hallett et al. (2016). Developmental toxicity of metaldehyde in the embryos of *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda: Pulmonata) co-exposed to the synergist piperonyl butoxide. *Science of The Total Environment* 543: 37-43.
- Hayasaka et al. (2012). Differences in susceptibility of five cladoceran species to two systemic insecticides, imidacloprid and fipronil. *Ecotoxicology* nº 21, pp.421–427.
- Hendriks and Stouten. (1993). Monitoring the response of microcontaminants by dynamic *Daphnia magna* and *Leuciscus idus* assays in the Rhine delta: biological early warning as a useful supplement. *Ecotoxicology and environmental safety*, 26(3), 265-279.
- Hidalgo et al. (2002). Cytotoxicity mechanisms of sodium hypochlorite in cultured human dermal fibroblasts and its bactericidal effectiveness. *Chemico-Biological Interactions* 139, 265-282.
- Hirano et al. (2004). Acute toxicity responses of two crustaceans, *Americamysis bahia* and *Daphnia magna*, to endocrine disrupters. *Journal of health science*, 50(1), 97-100.
- Hoehn-Saric et al. (1997). Obsessive-compulsive disorder with comorbid major depression: A comparison of sertraline and desipramine treatment. *European Neuropsychopharmacology*, 1002(7), S180-S181.
- Hohagen et al. (2015). An optimised whole mount in situ hybridisation protocol for the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *BMC Developmental Biology*, 15:19.
- Hohreiter and Rigg. (2001). Derivation of ambient water quality criteria for formaldehyde. *Chemosphere* 45, 471-486.

- Hudson. (2013). Ecotology of gold nanomaterials: effects on Periphyton, *L. Stagnalis*, and *H. Azteca* in na aquatic food chain study. Doctoral dissertation in Natural Resources and Environment. University of Michigan.
- Janssen and Persoone. (1993). Rapid toxicity screening tests for aquatic biota. 1. Methodology and experiments with *D. magna*. Environ Toxicol Chem 12:711-7.
- Jemec et al. (2007). Comparative toxicity of imidacloprid, of its comercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna*. Chemosphere, nº68, pp.1408–1418
- Kasting, J. (1993). Earth's early atmosphere. Science 259, 920-926
- Kayange. (2013). Use of snails as a bioindicators of Mercury pollution in aquatic ecosystems. Doctoral dissertation in public health and food safety. Sokoine University of Agriculture. Morogoro, Tanzania.
- Kivaisi. (2001). The potential for constructed wetlands for wastewater treatment and reuse in developing countries: a review. Ecol. Eng. (v.16, p.545-560).
- Keller et al. (1998). Maintenance phase efficacy of sertraline for chronic depression: a randomized controlled trial. Jama, 280(19), 1665-1672.
- Kramer and Botterweg. (1991). Aquatic biological early warning systems: an overview. Bioindicators and environmental management: 95-126
- Lalah et al. (2007). Effects of a branched p-nonylphenol isomer (4(30,60-dimethyl-30-heptyl)-phenol) on embryogenesis in *Lymnaea stagnalis* L. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 52(1), 104.
- Langer-Jaesrich et al. (2010). Assessing Toxicity of the Insecticide Thiacloprid on *Chironomus riparius* (Insecta: Diptera) Using Multiple End Points. Arch. Environ. Contam. Toxicol., nº 58, pp.963–972
- Lazorchak and Josephs. (2003). A compendium of chemical, physical and biological methods for assessing and monitoring the remediation of contaminated sediment sites (Washington DC, USA: Environmental Protection Agency), pp. 273.
- Leonard and Wood. (2013). Acute toxicity, critical body residues, Michaelis–Menten analysis of bioaccumulation, and ionoregulatory disturbance in response to waterborne nickel in four invertebrates: *Chironomus riparius*, *Lymnaea stagnalis*, *Lumbriculus variegatus* and *Daphnia pulex*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 158, 10–21.

- Lepola et al. (2003). Sertraline versus imipramine treatment of comorbid panic disorder and major depressive disorder. *The Journal of clinical psychiatry*, 64(6), 654-662.
- Li. (2009). Toxicity of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid to plants and aquatic invertebrates. *Environmental Toxicology*, 24, 95–101.
- Liu et al. (2013). Sensitivity of isolated eggs of pond snails: a new method for toxicity assays and risk assessment. *Environ. Monit. Assess.* 185, 4183-4190.
- Loose and Koene. (2008). Sperm transfer is affected by mating history in the simultaneously hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis*. *Invertebr. Biol.* 127, 162–167.
- Londborg et al. (1998). Sertraline in the treatment of panic disorder: a multi-site, double-blind, placebo-controlled, fixed-dose investigation. *The British Journal of Psychiatry*, 173(1), 54-60.
- Loprinzi et al. (2000). Venlafaxine in management of hot flashes in survivors of breast cancer: a randomised controlled trial. *The Lancet*, volume 356, pp.2059-2063.
- Loureiro et al. (2010). Toxicity of three binary mixtures to *Daphnia magna*: comparing chemical modes of action and deviations from conceptual models. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(8), 1716-1726.
- Magalhães et al. (2007). Behavioral response of zebrafish *Danio rerio* Hamilton 1822 to sublethal stress by sodium hypochlorite: ecotoxicological assay using an image analysis biomonitoring system. *Ecotoxicology* 16, 417-422.
- Malev et al. (2012). Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to non- target aquatic organisms: Microalgae *Desmodesmus subspicatus* and amphipod *Gammarus fossarum*. *Pestic. Biochem. Physiol.* N° 104, pp.178–186.
- Marois and Croll. (1991). Factors influencing hatching synchrony within the egg mass of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Invert. Reprod. Develop.*, 19, 139-146.
- Mazur et al. (2016): A *Lymnaea stagnalis* embryo test for toxicity bioindication of acidification and ammonia pollution in water. *Water* 8.7 (2016): 295.
- Mazur et al. (2013). The application of the *Lymnaea stagnalis* embryo-test in the toxicity bioindication of surfactants in fresh waters. *Ecological Indicators* 30, 190–195.

- Mergl et al. (2018). One-year follow-up of a randomized controlled trial of sertraline and cognitive behavior group therapy in depressed primary care patients (MIND study). *Journal of affective disorders*, 230, 15-21.
- Meshcheryakov. (1990). The common pond snail *Lymnaea stagnalis*. In *Animal species for developmental studies* (pp. 69-132). Springer US.
- Minguez et al. (2014). Acute toxicity of 8 antidepressants: What are their modes of action?. *Chemosphere*, 108, 314-319.
- Monarca et al. (2004). A new approach to evaluating the toxicity and genotoxicity of disinfected drinking water. *Water Research* 38, 3809-3819.
- Munley et al. (2013). Growth inhibition in early life-stage tests predicts full life-cycle toxicity effects of lead in the freshwater pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis*. *Aquatic Toxicology* 128– 129, 60– 66.
- Munley et al.. (2013). Growth inhibition in early life-stage tests predicts full life-cycle toxicity effects of lead in the freshwater pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis*. *Aquatic toxicology*, 128, 60-66.
- Ninan et al. (2006). High-dose sertraline strategy for nonresponders to acute treatment for obsessive-compulsive disorder: a multicenter double-blind trial. *The Journal of clinical psychiatry*.
- Ng et al.. (2011). Mechanisms of waterborne Cu toxicity to the pond snail *Lymnaea stagnalis*: Physiology and Cu bioavailability. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1471–1479.
- NIH. (2018). Consultado em junho 20, 2018 em: <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/sya-bpa/index.cfm>
- Nimkerdphol and Nakagawa., (2008). Effect of Sodium Hypochlorite on Zebrafish Swimming Behavior Estimated by Fractal Dimension Analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 105 (5), 486-492.
- Notícias ao Minuto. (2015). Consultado em junho 12, 2018 em: <https://www.noticiasao minuto.com/lifestyle/410807/garrafas-de-agua-fabricadas-em-portugal-isentas-de-bisfenol-a>
- OECD. (2014). Fish Toxicity Testing Framework, OECD Series on Testing and Assessment, No. 177, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264221437-en>.

- Osterauer and Köhler. (2008). Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, nº 86, pp.485–494
- Phillips and Bode. (2004). Pesticides in surface water runoff in south-eastern New York Sate, USA: seasonal and stormflow effects on concentrations. *Pest Manage Sci* 60:531–543
- Pohl et al. (1998). Sertraline in the treatment of panic disorder: a double-blind multicenter trial. *American Journal of Psychiatry*, 155(9), 1189-1195.
- Pollack et al. (1998). Sertraline in the treatment of panic disorder: a flexible-dose multicenter trial. *Archives of general psychiatry*, 55(11), 1010-1016.
- Pollack et al. (2007). A double-blind study of the efficacy of venlafaxine extended-release, paroxetine, and placebo in the treatment of panic disorder. *Depression and anxiety*, 24(1), 1-14.
- Poornima et al. (2005). Impact of thermal discharge from a tropical coastal power plant on phytoplankton. *Journal of Thermal Biology* 30, 307-316.
- Pubchem. (2018). Consultado em maio 22, 2018 em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/sodium_hypochlorite#section=Information-Sources
- Pubchem. (2018). Consultado em junho 20, 2018 em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/formaldehyde#section=Top>
- Pubchem. (2018). Consultado em julho 14, 2018 em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6623#section=OSHA-Chemical-Sampling>
- Pubchem. (2018). Consultado em julho 15, 2018 em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/venlafaxine#section=Top>
- Pubchem. (2018). Consultado em julho 20, 2018 em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/63009#section=Therapeutic-Uses>
- Pubchem. (2018). Consultado em agosto 15, 2018 em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/115224#section=Top>
- Pubchem. (2018). Consultado em agosto 20, 2018 em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Imidacloprid#section=Top>

- Public Health Statement. (2018). Consultado em junho 13, 2018 em: <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp111-c1-b.pdf>
- Radwan and Mohamed. (2013). Imidacloprid induced alterations in enzyme activities and energyReserves of the land snail, *Helix aspersa*. Ecotoxicology and Environmental Safety nº 95, pp.91–97.
- Rapado et al. (2013). Schistosomiasis control using pipartine against *Biomphalaria glabrata* at different developmental stages. PLoS Negl Trop Dis 7(6): e2251.
- Rapaport et al. (2001). Sertraline treatment of panic disorder: results of a long-term study. Acta Psychiatrica Scandinavica, 104(4), 289-298.
- Reimherr et al. (1990). Antidepressant efficacy of sertraline: a double-blind, placebo-and amitriptyline-controlled, multicenter comparison study in outpatients with major depression. The Journal of clinical psychiatry.
- Rittschof and McClellan-Green. (2005). Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. Marine Pollution Bulletin 50:369-373.
- Rothbaum et al. (1996). Sertraline in the treatment of rape victims with posttraumatic stress disorder. Journal of traumatic stress, 9(4), 865-871.
- Rouissat et al. (2015). Molluscicidal activity of the Saharian medicinal plants *Limoniastrum feei* and *Launaea nudicaulis* against the fresh water snail *Lymnaea stagnalis*. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences (JBES), Vol. 7, No. 6, p. 242-248.
- Rowbotham et al. (2004). Venlafaxine extended release in the treatment of painful diabetic neuropathy: a double-blind, placebo-controlled study. Pain, 110(3), pp.697-706.
- Rush et al. (2006). Bupropion-SR, sertraline, or venlafaxine-XR after failure of SSRIs for depression. The New England journal of medicine, volume 354 nº12, pp.1231-1242.
- Saraiva. (2015). Avaliação da eficiência da desinfecção de efluentes urbanos com recurso a cloro. Tese de Mestrado em Engenharia do Ambiente - Perfil Engenharia Sanitária. Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa. Lisboa. 64 pp.

- Sawasdee and Köhler. (2009). Embryo toxicity of pesticides and heavy metals to the ramshorn snail, *Marisa cornuarietis* (Prosobranchia). Chemosphere nº 75, pp.1539–1547.
- Schlekat et al. (2010). Cross-species extrapolation of chronic nickel Biotic Ligand Models. Sci. Tot. Environ. 408, 6148–6157.
- Slooff et al. (1983). Detection limits of a biological monitoring system for chemical water pollution based on mussel activity. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 30(1), 400-405.
- Sluyts et al. (1996). A dynamic new alarm system for use in biological early warning systems. Environmental Toxicology and Chemistry 15.8, 1317-1323.
- Smirthwaite et al. (2007). An integrative approach identifies developmental sequence heterochronies in freshwater basommatophoran snails. Evolution & development, 9(2), 122-130.
- Soucek and Dickinson. (2012). Acute Toxicity of Nitrate and Nitrite to Sensitive Freshwater Insects, Mollusks, and a Crustacean. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 62:233–242.
- Storey et al. (2011). Advances in on-line drinking water quality monitoring and early warning systems. Water Research 45 (2), 741- 747.
- Stoughton et al. (2008). Acute and Chronic Toxicity of Imidacloprid to the Aquatic Invertebrates *Chironomus tentans* and *Hyaella azteca* under Constant- and Pulse-Exposure Conditions. Arch. Environ. Contam. Toxicol., nº54, pp.662–673.
- Styrishave et al. (2011). Environmental risk assessment of three selective serotonin reuptake inhibitors in the aquatic environment: a case study including a cocktail scenario. Environmental Toxicology and Chemistry, 30(1), 254-261.
- Thase (1998). Effects of Venlafaxine on Blood Pressure: A Meta-Analysis of Original Data From 3744 Depressed Patients. J Clin Psychiatry, 59(10), pp.502-508.
- Tills et al. (2013). Parent–offspring similarity in the timing of developmental events: an origin of heterochrony?. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 280(1769), 20131479.
- Tomizawa and Casida. (2003). Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. Annu. Rev. Entomol. N°48, pp.339–364.

- Tomizawa and Casida. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* N°45, pp.247–268.
- Tufi et al. (2015). Metabolomics to Explore Imidacloprid-Induced Toxicity in the Central Nervous System of the Freshwater Snail *Lymnaea stagnalis*. *Environ. Sci. Technol.* N°49, pp.14529–14536.
- Ünlü et al. (2005). Histopathological effects in tissues of snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata) exposed to sublethal concentration of Thiodan® and recovery after exposure. *J. Appl. Toxicol.*, n°25, pp.459–463.
- Van der Schalie et al. (2001). Using higher organisms in biological early warning systems for real-time toxicity detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(7), 457-465.
- Vaughan and Egmond. (2010). The use of the zebrafish (*Danio rerio*) embryo for the acute toxicity testing of surfactants, as a possible alternative to the acute fish test. *Altern Lab Anim.* 38 (3), 231–238.
- Versonnen and Janssen. (2004) Xenoestrogenic effects of ethinylestradiol in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology*, 19: 198 – 206.
- Vieta et al. (2002). A randomized trial comparing paroxetine and venlafaxine in the treatment of bipolar depressed patients taking mood stabilizers. *The Journal of clinical psychiatry*, 63(6), 508-512.
- Villegas-Navarro et al. (1997). Determination of LC50 from *Daphnia magna* in treated industrial waste waters and non-treated hospital effluents. *Environment International*, Vol. 23, No. 4, pp. 535-540
- Walker. (2012). *Principles of Ecotoxicology*. Fourth Edition. Boca Raton: CRC Press.
- Wagner. (2000). Influence of sewage from different water treatment plants in the Cracow Region (Poland) on early developmental stages of water snails. *Lakes Reservoirs: Res. Manage.* 5 (2), 83–88.
- Yang et al. (2014). Development of PFOS and PFOA criteria for the protection of freshwater aquatic life in China. *Sci. Total Environ.* 470-471, 677-683.

6. Anexos

Anexo I - Preparação do meio para *Lymnaea stagnalis* (Snail Water)

A preparação do meio descrito, segue as indicações presentes em “OECD 243 - Guideline for the testing of chemicals, Lymnaea stagnalis reproduction test”.

Componentes

- 1 - Cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$)
- 2 - Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$)
- 3 - Hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO_3)
- 4 - Cloreto de potássio (KCl)

Material

- Balão de 1000 ml
- Garrafão de plástico de 5L
- Gobelé
- HCl
- Leitor de pH
- NaOH
- Pipeta
- Proveta de 1000 ml

Procedimento (preparação de 5 litros):

- 1- Pipetar 25 ml* de cada constituinte por ordem (1-2-3-4) para um balão de 1000 ml;
- 2- Preencher o balão com água desionizada até aos 1000 ml;
- 3- Verter para um recipiente (por exemplo, garrafão de plástico de 5 litros) o conteúdo presente no balão;

- 4- Utilizando uma proveta de 1000 ml, completar o garrafão com os restantes 4L de água desionizada, misturando o conteúdo;
- 5- Colocar alguma quantidade de meio preparado num gobelé;
- 6- Proceder à leitura do pH (tem de estar compreendido entre 7.9 e 8.2);
- 7- Acertar o pH consoante seja necessário – adicionar algumas gotas de HCl se for superior a 8.2; adicionar algumas gotas de NaOH se o pH for inferior a 9.7.
- 8- Fazer nova leitura para confirmar o acerto de pH.

* Por cada litro de *Snail water*, é necessário pipetar 5 ml de cada componente. Neste caso como se prepara 5L, pipeta-se 25 ml de cada componente.

Referência Bibliográfica

OECD Test No. 243: *Lymnaea stagnalis* Reproduction Test, OECD Publishing.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264264335-en>

Anexo II - Métodos de lavagem e individualização de ovos

Material necessário:

- Bisturi
- Câmara de fotografar
- Cronómetro
- Gobelés
- Lupa
- Micropipeta
- Pinças
- Placas de 24 poços
- Placas de petri
- *Snail Water*

Procedimento:

1. Preparar *Snail water*, em quantidade suficiente.
2. Preparar 3 gobelés de 3 litros com 1 litro de *Snail water* em cada.
3. Colocar 4 progenitores de tamanho semelhante em cada gobelé.
4. Alimentar os progenitores *ad libitum*.
5. Renovar o meio dos progenitores ao sábado e terça.
6. Verificar a existência de massas de ovos (de hora a hora no 1º dia de ensaio, desde as 9h até às 20h; às 9h, 13h e 20h no 2º dia; às 13h nos restantes dias até ao fim do ensaio).
7. Registar o local e a hora em que foram colocadas massas de ovos.
8. Retirar as massas de ovos e proceder a uma lavagem das mesmas. Para essa lavagem preparar 3 gobelés de 600ml com 500ml de água da torneira; de seguida colocar a massa no primeiro gobelé e agitar suavemente com auxílio de um pincel durante 1 min; proceder de igual forma com os outros dois gobelés. Este método foi adaptado do método descrito por Marois and Croll (1991).
9. Selecionar uma massa de ovos da placa de petri, colocá-la em papel de filtro e, à lupa, dividir a massa ao meio.
10. Guardar metade da massa de ovos na placa de petri, devidamente identificada, como controlo.

11. Com o auxílio de duas pinças, isolar os ovos que se encontram na metade da massa sobranete.
12. Colocar os ovos isolados em placas de 24 poços, devidamente preenchidos com 2ml de *Snail water*.
13. Em cada poço colocar apenas 5 indivíduos (metade da densidade utilizada por Liu et al. 2013), contudo utilizar os ovos pertencentes à metade da massa de ovos, ocupando o número de poços que for necessário.
14. Renovar o meio dos poços diariamente, com ajuda da micropipeta.
15. À lupa observar as diferentes fases embrionárias, assim como eventuais mortalidades ou malformações (de hora a hora no 1º dia do ensaio; às 9h, 13h e 20h no 2º dia; às 13h do 3º dia até ao fim do ensaio).
16. Excluir do ensaio os ovos que apresentem deformações ou mortalidade.
17. Proceder a um registo fotográfico e manuscrito das diferentes fases e eventos visíveis em cada fase embrionária.
18. No final comparar os embriões que provêm de ovos isolados com os embriões provenientes da massa de ovos intacta, de forma a observar possíveis diferenças. Registrar essas diferenças.

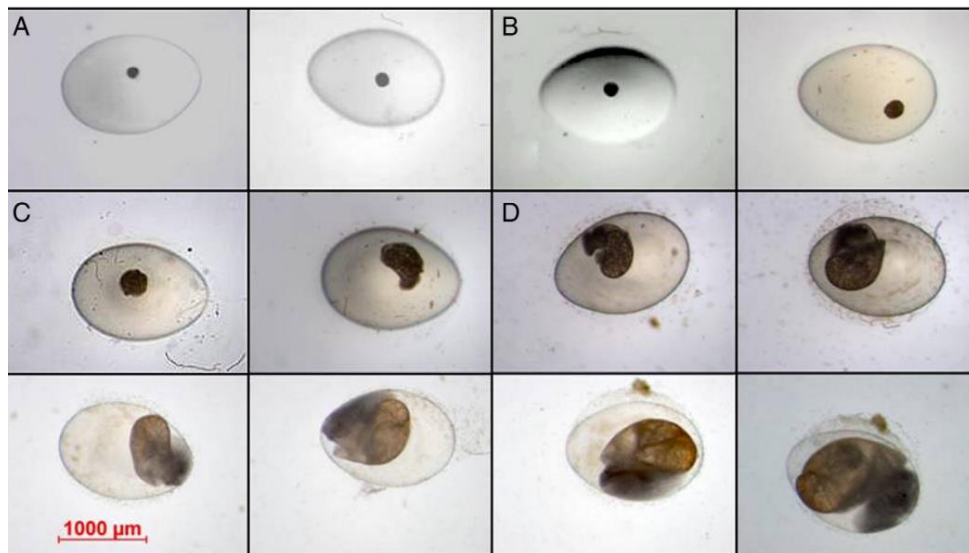


Fig.1 - Fases embrionárias de *Lymnaea stagnalis* como descrito por Bandow and Weltje (2012). (A)-Mórula; (B)-Trocófora; (C)-Velliger; (D)-Hippo.

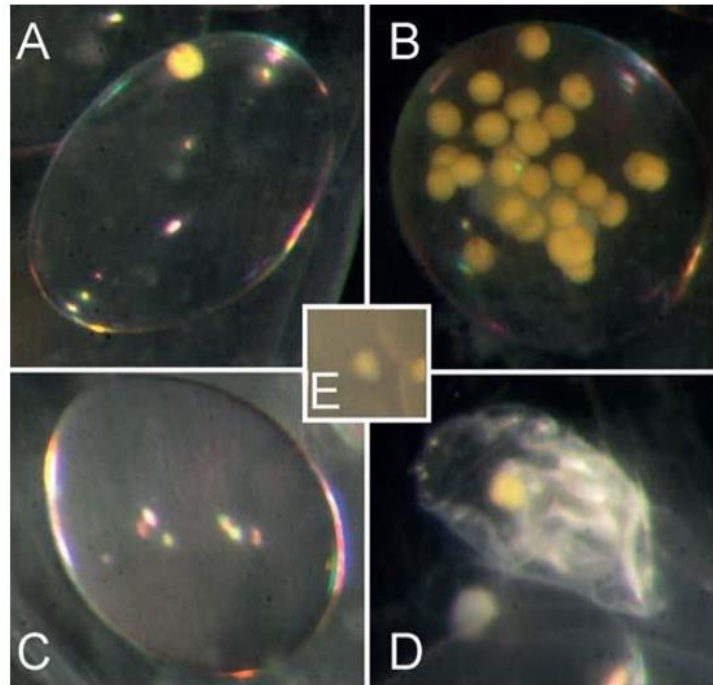


Fig.2 - Deformações embrionárias nos ovos de *Lymnaea stagnalis* como descrito por Giusti et al. (2013). (A)-normal; (B)-poliembriõnia; (C)-não fertilizado; (D)-albúmen danificado; (E)-célula embrionária sem albúmen.

Referências bibliográficas

- Arambaši, et al. (2013). Pond Snail *Lymnaea stagnalis* L.: The Implication for Basic and Applied Research. World Applied Sciences Journal, 25(10), 1438-1448.
- Barsi et al. (2014). Considerations for test design to accommodate energy-budget models in ecotoxicology: A case study for acetone in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. Environmental toxicology and chemistry, 33(7), 1466-1475.
- Bandow and Weltje. (2012). Development of an embryo toxicity test with the pond snail *Lymnaea stagnalis* using the model substance tributyltin and common solvents. Science of the total environment, 435, 90-95.
- Byrne et al. (2009). Embryonic rotational behaviour in the pond snail *Lymnaea stagnalis*: influences of environmental oxygen and development stage. Zoology 112, 471-477.

- Giusti et al. (2013). Reproductive impacts of tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPT) in the hermaphroditic freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*. Environmental Toxicology and Chemistry 32:1552–1560.
- Hallett et al. (2016). Developmental toxicity of metaldehyde in the embryos of *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda: Pulmonata) co-exposed to the synergist piperonyl butoxide. Science of The Total Environment 543: 37-43.
- Liu et al. (2013). Sensitivity of isolated eggs of pond snails: a new method for toxicity assays and risk assessment. Environ. Monit. Assess. 185, 4183-4190.
- Marois and Croll. (1991). Factors influencing hatching synchrony within the egg mass of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. Invert. Reprod. Develop., 19, 139-146.
- OECD 243. Guideline for the testing of chemicals, *Lymnaea stagnalis* Reproduction Test.
- Sarker et al. (2007). Embryonic developmental ecology of freshwater snail *Lymnaea acuminata* (Lymnaeidae: Gastropoda). Pakistan journal of biological sciences: PJBS, 10(1), 23-31.

Anexo III - Avaliação do desenvolvimento embrionário de ovos de *Lymnaea stagnalis* na presença ou ausência da massa gelatinosa que confere proteção aos ovos

Material necessário:

- Balança
- Bisturi
- Gobelés
- Lupa
- Micropipeta
- Papel de filtro
- Pincel
- Pinças
- Placas de petri
- Placas 24 poços
- *Snail water*

Procedimento:

1. Antes de iniciar o ensaio verificar a existência de massas de ovos. Caso haja, excluí-las uma vez que foram colocadas antes do início do ensaio.
2. Quando iniciado o ensaio, verificar a existência de massas de ovos (de hora a hora o 1º dia; às 9h, 11h e 20h no 2º dia; às 11h desde o 3º dia até ao último).
19. Recolher as massas de ovos e realizar uma lavagem. Para isso encher um gobelé de 600 ml com 500ml de água da torneira e colocar lá as massas durante 1 min enquanto se agita com um pincel suavemente. Repetir o processo em mais dois gobelés de igual tamanho. Este método foi adaptado do método descrito por Marois and Croll, (1991).
3. Feita a lavagem, pesar a massa de ovos e anotar o valor.
4. Cortar em 6 partes iguais a massa de ovos sem danificar os ovos que se encontram no seu interior.
5. Preparar placas de 24 poços com 2ml de *Snail water*.
6. Preencher cada poço de uma fila com os 6 pedaços de massa, cumprindo as seguintes condições:

Poço 1 - ovos dentro da massa de ovos (controlo);

Poço 2 - ovos individualizados e completamente limpos de geleia;

Poço 3 - ovos individualizados e completamente limpos de geleia colocados por cima da geleia;

Poço 4 - ovos individualizados e completamente limpos de matriz gelatinosa com X/1 gramas de massa de ovos cortada aos bocadinhos e colocada nos poços, mas sem tocar nos ovos. Uma vez que a primeira massa pesava 0.175g, $x/1=0.08g$;

Poço 5 - ovos individualizados e completamente limpos de matriz gelatinosa com X/2 gramas de massa de ovos cortada aos bocadinhos e colocada nos poços, mas sem tocar nos ovos. Uma vez que a primeira massa pesava 0.175g, $x/2=0.04g$;

Poço 6 - ovos individualizados e completamente limpos de matriz gelatinosa com X/4 gramas de massa de ovos cortada aos bocadinhos e colocada nos poços, mas sem tocar nos ovos. Uma vez que a primeira massa pesava 0.175g, $x/4=0.02g$.

Cálculo para saber que quantidade de massa de ovos deve ser colocada em cada poço:

Massa de ovos = 0.175g

$$X + x/2 + x/4 = 0.175 \Leftrightarrow 7x/4 = 0.175 \Leftrightarrow x = 0.1g,$$

Logo $x = 0.1g$, $x/2 = 0.05g$ e $x/4 = 0.025g$.

De forma a ficar proporcional designou-se que $x = 0.08g$, $x/2 = 0.04g$ e $x/4 = 0.02g$.

Ter em conta que:

- A quantidade de matriz gelatinosa para os últimos 3 poços pode ser obtida a partir dos poços 2, 4, 5 e 6.
 - A quantidade de matriz gelatinosa usada nos últimos 3 poços tem de ser igual nas restantes massas colhidas ($x/1 = 0.08g$; $x/2 = 0.04g$; $x/4 = 0.02g$).
 - O número de ovos por poço deve ser superior a 3 e nunca inferior a 2.
 - O número de massas de ovos a utilizar será aquele necessário para se obter 20 ovos por condição, incluindo as condições dos poços 4, 5 e 6, mas nunca inferior a 3.
 - As massas de ovos não têm que ser obtidas todas ao mesmo tempo, mas terão que ter o mesmo tempo de desenvolvimento, de preferência não mais que 1 hora.
7. Terminados os pontos anterior proceder a leituras, na lupa, assim como registo fotográfico de todas as fases de desenvolvimento e eventos (de hora a hora no 1º dia; às 9h, 11h e 20h no 2º dia; às 11h da manhã até ao fim do ensaio).
 8. Proceder à troca do meio, em todos os poços, diariamente.

Referências bibliográficas

Marois and Croll. (1991). Factors influencing hatching synchrony within the egg mass of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. Invert. Reprod. Develop., 19, 139-146.

Anexo IV - Teste de toxicidade utilizando 10 compostos tóxicos

Material necessário

- Bisturi
- Cronómetro
- Gobelés de vidro
- Lupa Zeiss Stemi 2000-C e câmara Leica EC3
- Luvas
- Micropipeta
- Papel de filtro
- Pincel
- Pinças
- Placas 96 poços
- *Snail water*
- Tóxicos

Lista dos tóxicos a utilizar:

- Bisfenol A
- Etanol
- Formaldeído
- Ácido Heptadecafluorooctanesulfonic
- Imidacloprida
- Ácido Perfluoro-octanoico
- Sertralina
- Hipoclorito de Sódio
- Tiaclopride
- Venlafaxina

Preparação dos tóxicos

1. Preparar 5 concentrações do tóxico com fator de diluição 10x.
2. Antes do início do teste, saturar os poços das placas durante pelo menos 1 hora, de forma a evitar que haja absorção da quantidade de tóxico durante o ensaio.

Procedimento

3. Preparar *Snail water*, em quantidade suficiente.
4. Preparar 3 gobelés de 3 litros com 1 litro de *Snail water* em cada.
5. Colocar 4 progenitores de tamanho semelhante em cada gobelé.
6. Alimentar os progenitores *ad libitum*.
7. Renovar o meio dos progenitores à sexta.
8. Verificar continuamente a existência de massas de ovos, de forma a serem usadas recém colocadas.
9. Retirar as massas de ovos e proceder a uma lavagem das mesmas. Para essa lavagem preparar 3 gobelés de 600ml com 500ml de água da torneira; de seguida colocar a massa no primeiro gobelé e agitar suavemente com auxílio de um pincel durante 1 min; proceder de igual forma com os outros dois gobelés. Este método foi adaptado do método descrito por Marois, and Croll, (1991).
10. Com auxílio de uma micropipeta, preencher as placas de 96 poços da seguinte forma:

Fila A - controlo de ovos isolados (*snail water*) correspondente a 0x o valor máximo de 48h LC50 para *Daphnia*

Fila B - concentração correspondente a 0.1x o valor máximo de 48h LC50 para *Daphnia*

Fila C - concentração correspondente a 1x o valor máximo de 48h LC50 para *Daphnia*

Fila D - concentração correspondente a 10x o valor máximo de 48h LC50 para *Daphnia*

Fila E - concentração correspondente a 100x o valor máximo de 48h LC50 para *Daphnia*

11. À lupa, com o auxílio de um bisturi e duas pinças, isolar os ovos que se encontram na massa.

12. Avaliar a possível existência de ovos que se encontrem danificados, procedendo à exclusão destes do teste.
13. Colocar os ovos isolados em placas de 96 poços (um ovo por poço num total de 6 por condição). Nota: utilizar apenas ovos que ainda não se encontrem em rotação.
14. Renovar à segunda e sexta a solução presente em cada poço, utilizando para isso uma micropipeta (no 1º e 2º dia utilizar meio contendo químico; a partir do 3º dia até ao fim do ensaio utilizar apenas *Snail water*).
15. Proceder de igual forma para todos os tóxicos.

Leituras

16. Proceder a um registo diário (fotográfico e manuscrito) das fases embrionárias, mortalidades e malformações ocorridas (de hora a hora no 1º dia; de 24 em 24h após o 2º dia do ensaio até ao final).

Preparação dos químicos

Tabela 1 - Valores de LC50 para 48h para *Daphnia* encontrados na literatura e concentrações de cada tóxico utilizadas para os testes toxicológicos, em mg/L.

Químico	48h LC50 <i>Daphnia</i>	1 Concentração	2 Concentração	3 Concentração	4 Concentração	5 Concentração	6 Concentração	Controlo
Bisfenol A	12.8	100	10	1	0.1	-	-	0
Etanol	10479.5	100	10	1	0.1	-	-	0
Formaldeído	29	100	10	1	0.1	0.01	0.001	0
Ácido	112	100	10	1	0.1	-	-	0
Heptadecafluoro octanesulfónico								
Imidacloprida	97	100	10	1	0.1	-	-	0
Ácido Perfluoro- octanoico	201.9	100	10	1	0.1	-	-	0

Sertralina	1.2	100	10	1	0.1	-	-	0
Hipoclorito de Sódio	0.04	5	0.5	0.05	0.005	0.0005	0.00005	0
Tiaclopride	88	100	10	1	0.1	-	-	0
Venlafaxina	141.3	100	10	1	0.1	-	-	0

Referências bibliográficas

- Marois and Croll. (1991). Factors influencing hatching synchrony within the egg mass of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. Invert. Reprod. Develop., 19, 139-146.
- Li. (2009). Toxicity of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid to plants and aquatic invertebrates. Environmental Toxicology, 24, 95–101.
- Yang et al. (2014). Development of PFOS and PFOA criteria for the protection of freshwater aquatic life in China. Sci. Total Environ. 470-471, 677-683.
- Loureiro et al. (2010). Toxicity of three binary mixtures to *Daphnia magna*: comparing chemical modes of action and deviations from conceptual models. Environmental Toxicology and Chemistry, 29(8), 1716-1726.
- Minguez et al. (2014). Acute toxicity of 8 antidepressants: What are their modes of action?. Chemosphere, 108, 314-319.
- Hartgers et al. (1999). Effect of lindane on the clearance rate of *Daphnia magna*. Archives of environmental contamination and toxicology, 36(4), 399-404.
- Pedersen and Petersen. (1996). Variability of species sensitivity to complex mixtures. Water Sci Technol 33:109–19
- Martin et al. (2005). Multigenerational acclimation of *Daphnia magna* to mercury: relationships between biokinetics and toxicity. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 24, No. 11, pp. 2927–2941

Janssen and Persoone. (1993). Rapid toxicity screening tests for aquatic biota.

1. Methodology and experiments with *D. magna*. Environ Toxicol Chem 12:711-7.

Villegas-Navarro et al. (1997). Determination of LC50 from *Daphnia magna* in treated industrial waste waters and non-treated hospital effluents. Environment International, Vol. 23, No. 4, pp. 535-540

Hirano et al. (2004). Acute toxicity responses of two crustaceans, *Americamysis bahia* and *Daphnia magna*, to endocrine disrupters. Journal of health science, 50(1), 97-100.

Genoni (1997). Influence of the energy relationships of organic compounds on toxicity to the Cladoceran *Daphnia magna* and the fish *Pimephales promelas*. Ecotoxicol Environ Saf 36:27–37

den Broeder et al. (2017). Altered Adipogenesis in Zebrafish Larvae Following High Fat Diet and Chemical Exposure Is Visualised by Stimulated Raman Scattering Microscopy. International journal of molecular sciences, 18(4), 894

Fernandes 2014). Evaluation over time of the detection capability of a video-tracking system through daily exposure of *Danio rerio* to sodium hypochlorite, ethanol or bisphenol A.

Liu et al. (2011). Analysis of behavioral changes of zebrafish (*Danio rerio*) in response to formaldehyde using Self-organizing map and a hidden Markov model. Ecological Modelling 222, 2191-2201.)

Hartgers et al. (1999). Effect of lindane on the clearance rate of *Daphnia magna*. Archives of environmental contamination and toxicology, 36(4), 399-404.

- Minguez et al. (2015). Transgenerational Effects of Two Antidepressants (Sertraline and Venlafaxine) on *Daphnia magna* Life History Traits. Environ. Sci. Technol. 49, 1148–1156
- Radwan and Mohamed. (2013). Imidaclopid induced alterations in enzyme activities and energy reserves of the land snail, *Helix aspersa*. Ecotoxicology and environmental safety 95, 91-97.)
- Langer-Jaesrich et al. (2010). Assessing Toxicity of the Insecticide Thiacloprid on *Chironomus riparius* (Insecta: Diptera) Using Multiple End Points. Arch Environ Contam Toxicol 58:963–972
- Mei-Hui Li (2008). Toxicity of Perfluorooctane Sulfonate and Perfluorooctanoic Acid to Plants and Aquatic Invertebrates. Environmental Toxicology DOI 10.1002/tox

Anexo V – Eventos do desenvolvimento embrionário de *Lymnaea stagnalis*

Fase	Evento	Description of event	Ref.	Event name (by authors)	Time after first cleavage furrow (ref. 2) (h:min)
Laying		Laying	1	Laying	
	1 cell	The cell is rounded.			
	2 cells	The cell have the form of two beans together.			
	4 cells	The cell have the form of four beans together.			
	6 cells	The cell have the form of six beans together.			
Early Gastrula	Blastopore	Blastopore rounded and wide.	2	Early Gastrula	32:40
Late Gastrula	Slow rotation (1rev/105 sec)	Cilia are active in the prototroch, foot, and several other regions of the body. The embryo rotates inside the capsule at a speed of 1 rev/105 sec.	2	Late Gastrula	49:30
Trocophore	Velum	Opaque appearance of the embryo is broken by a semi-transparent, helmet-like velum that extends further outwards than the rest of the embryo at this stage	3	Velum	
		The embryo weakly transparent.	2	Early Trochophore	52:30
	Liver cells	Liver cells are conspicuous and have formed a cuplike layer around the endodermal lumen [E3].	1	Trochophore	
		Liver cells visible as individual globular structures forming a cuplike layer running around the endodermal lumen	3	Liver cells	
	Fast rotation (1 rev/5 sec)	The embryo rotates, each rotation taking about 5 sec. It is more transparent than in the preceding stage.	2	Mid-trochophore	67:00
	Foot region appears	Foot region appears. Embryo is still rounded.	2	Late Trochophore	90:00

Early Veliger.	Two velar lobes	The embryo has developed two lobes at either end of the mass of larger cells that form the viscera. Both lobes are similar in shape and size at this point [E5]	1	Veliger	
		Two lobes at either end of the embryo have developed and extend to transform the embryo into a 'crescent moon'-like shape	3	Veliger	
		Rotation 1 rev/10 sec. Foot definitely segregated. Shell gland almost flat. Mantle folds are seen.	2	Early Veliger.	95:00
	Shell formation	The shell gland is almost flat; thickenings or mantle folds have formed near its borders and are in contact with the shell.	2	Early Veliger.	95:00
		Front edge of the shell becomes visible as a ridge extending around the mantle and this, later in development, extends down towards the head of the embryo.	3	Shell formation	
Mid-veliger	Heart beating	First visible heart beat. This begins as an irregular beat but as development progresses becomes more regular.	3	Heart beating	
	Eye spots	Onset of eye spot pigmentation.	3	Eye spots	
	Spontaneous foot movement	Rotation 1 rev/15 sec. Spontaneous foot movement. Mantle fold envelops one-third of visceral sac. Heart contractions. Eyes reddish in color.	2	Mid-veliger.	108:00

	Heart is located over the shell middle	Mantle fold envelops two-thirds of the visceral sac. Heart is located over the shell middle.	2	Mid-veliger.	115:00
Late Veliger or "Hippo"	Head of a hippopotamus	One lobe is larger and has changed its shape such that it resembles the head of a hippopotamus in some species. The visceral mass is completely covered by the shell, but the shell has not developed to cover the mantle muscle and head [E7]	1	Hippo stage (sensu Raven 1949)	
	First evidence for helical shell structure	Rotation irregular. Posteriorly the foot does not reach shell, may extend horizontally. First evidence for helical shell structure. Eyes are reddish. Beginning of radular teeth formation.	2	Late Veliger or "Hippo"	139:00
	The foot reaches the shell.	Posteriorly the foot reaches the shell.	2	Late Veliger or "Hippo"	145:00
	Dark eyes	Eyes are dark.	2	Late Veliger or "Hippo"	145:00
Veliconcha	Shell covers the whole visceral complex	Shell covers the whole visceral complex.	2	Veliconcha	165:00
	Heart on the left body side.	Heart on the left body side.	2	Veliconcha	165:00
		Foot is used for locomotion, sporadic rotation	2	Veliconcha	165:00

	Free swimming	The foot is fully formed, eye spots are identifiable, and heart beat is regular. The embryo resembles an adult, although some species may not have developed their full pigmentation at this stage. The embryo floats, moving around inside the egg, and it is possible to detect currents flowing into and out of the shell aperture in some species as the embryo moves (swims) around freely within the egg [E8]	1	Free swimming	
Body flexing	Body flexing	The first muscular contractions cause the body of the embryo to begin to flex through the ventral/dorsal axis. Flexing rate is irregular.	1	Body flexing	
		First muscular contraction causing the body of the embryo to flex, resulting in the mantle and foot moving closer together. This movement is similar to that seen in adult snails when they retract their shell.	3	Body flexing	
Mantle muscle control	Mantle muscle control	The first contractions of the mantle muscles. The muscle groups used to perform this function are distinct from those used in body flexing and are located on the dorsal side of the body. This muscle group enables the snail to pull the shell over its head.	1	Mantle muscle control	

Transition to Foot Movement	Foot attachment	The embryo is attached to the inside surface of the egg by its foot, but may still preferentially swim freely	1	Attachment to egg	
		Embryo uses muscular foot to attach to egg capsule wall, often only for very short periods before reverting back to gliding around the egg using cilia	3	Foot attachment	
	Crawling	After having attached to the inside of the egg, the embryo crawls around the inside of the egg in preference to swimming or floating [E9]	1	Crawling	
		Embryo uses its muscular foot after attachment to the egg capsule wall to crawl. Crawling is initially usually for only very short periods	3	Crawling	
		Embryo creeps using foot and may withdraw into the shell. Shell with helix.	2	Transition to Foot Movement	189:00
Use of radula	Use of radula	The point at which the radula was first observed and appeared to be functioning. It can be clearly observed to be moving although it does not actually rasp effectively until the juvenile snail is ready to hatch at which time the radula breaks through the egg capsule to effect hatching	1	Ontogeny of the radula	
		Radula begins functioning and its movement is visible within the embryo before it is extended outside of the head to use for rasping against the egg capsule wall.	3	Use of radula	
Hatching	Capsule rupture	Embryo uses radula to rupture the egg capsule wall.	3	Capsule rupture	
	Emergence from egg capsule	Snail emerges from egg capsule.	3	Hatching	
		The snail emerges from the egg capsule but may or may not emerge from the egg mass [E11].	1	Emergence from egg capsule	

	Migrate from egg mass	The snail emerges from the egg mass and moves away from it.	1	Migrate from egg mass	
		Hatching.	2	Hatching	272:00

Referências Bibliográficas

- 1 - Smirthwaite et al. (2007). An integrative approach identifies developmental sequence heterochronies in freshwater basommatophoran snails. *Evolution & development*, 9(2), 122-130.
- 2 - Meshcheryakov. (1990). The common pond snail *Lymnaea stagnalis*. In *Animal species for developmental studies* (pp. 69-132). Springer US.
- 3 - Tills, Rundle and Spicer. (2013). Parent–offspring similarity in the timing of developmental events: an origin of heterochrony?. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 280(1769), 20131479.

Anexo VI – Fases de desenvolvimento embrionário em fotografia

Todas as imagens apresentadas neste anexo foram recolhidas durante a realização desta dissertação, com o auxílio de uma lupa Zeiss Stemi 2000-C e câmara Leica EC3. A escala utilizada está inserida em todas as imagens.

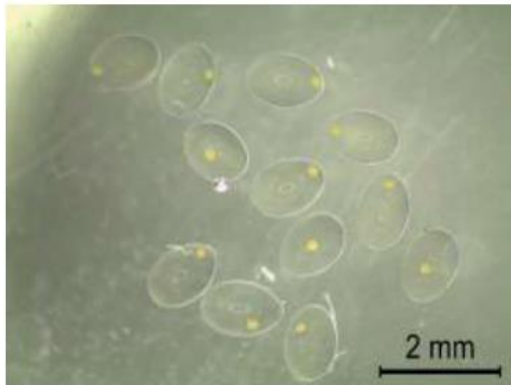


Fig.1 - Visão geral dos ovos isolados.

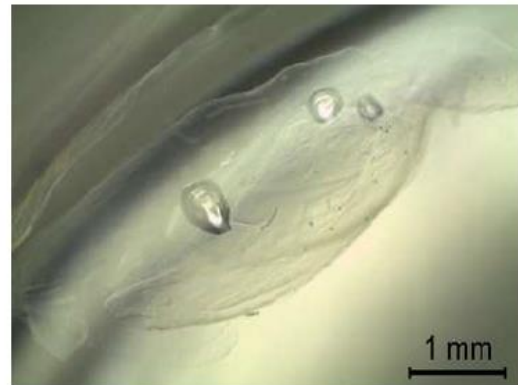


Fig.2 – Massa de ovos vazia.

Fase Mórula

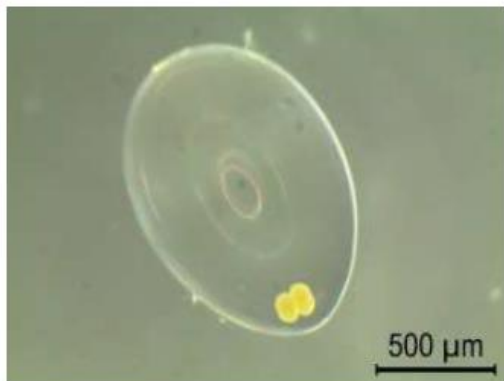


Fig.3 - 1º Dia - 2 Células.

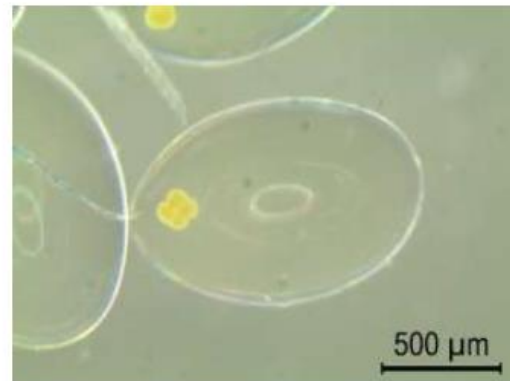


Fig.4 - 1º Dia - 4 Células.

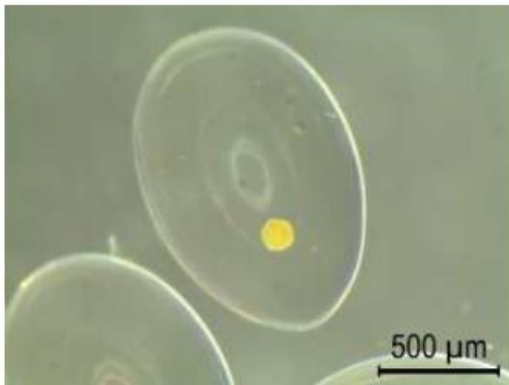


Fig.5 - 1º Dia - 6 Células.

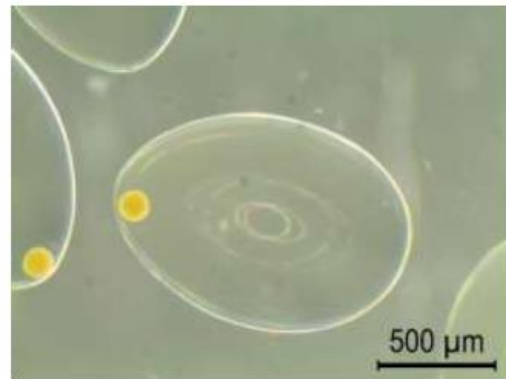


Fig.6 – Mais de 64 células.



Fig.7 - 2º Dia.

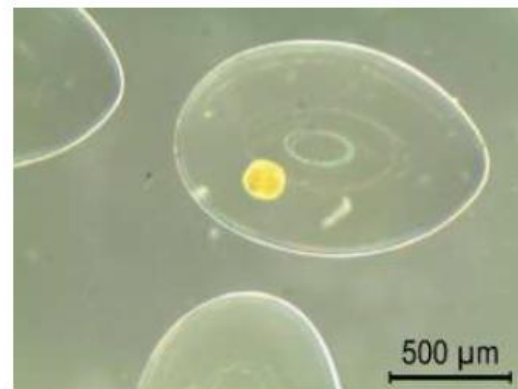


Fig.8 - 3º Dia.

Fase Trocófora



Fig.9 - 4º Dia.



Fig.10 - 5º Dia.

Fase Velliger

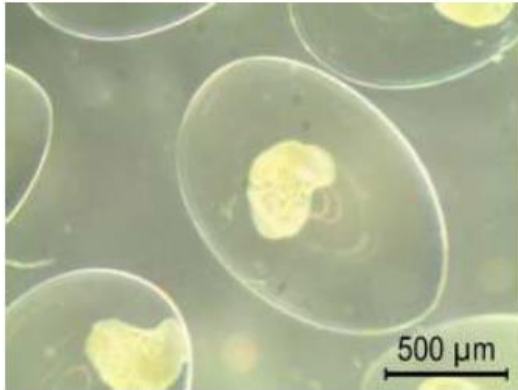


Fig. 11 - 7º Dia.



Fig. 12 - 8º Dia.



Fig. 13 - 10º Dia.



Fig. 14 - 12º Dia.

Fase Hippo



Fig. 15 - 14º Dia.



Fig. 16 - 15º Dia.



Fig.17 - 16º Dia.



Fig.18 - 17º Dia.

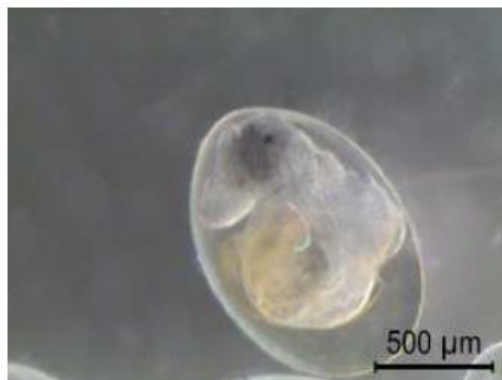


Fig.19 - 18º Dia.

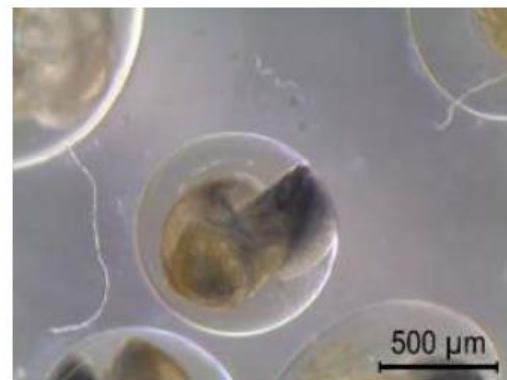


Fig.20 - 19º Dia.

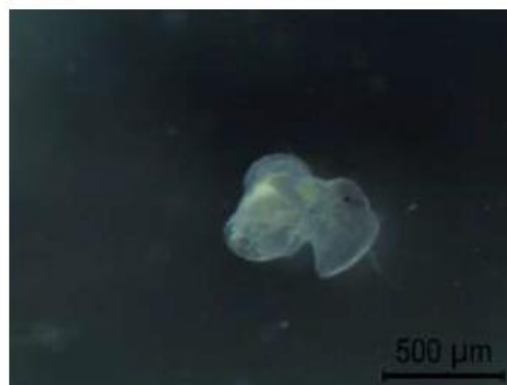


Fig.21 - 20º Dia – Eclosão.

Mortalidades



Fig.22 - Embrião Morto (fase Mórula).

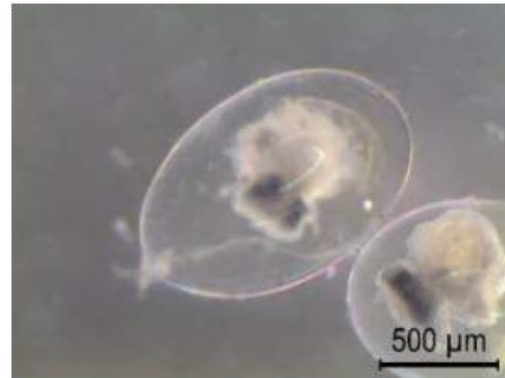


Fig.23 - Embrião Morto (fase Hippo).



Fig.24 - Embrião Morto e Embrião Vivo.

Anomalias

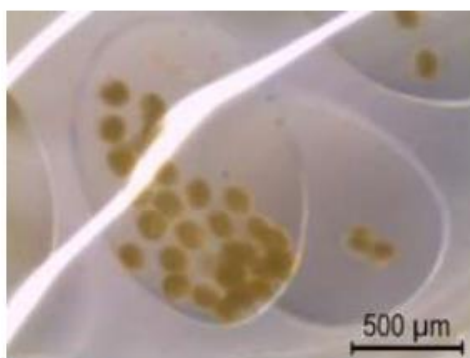


Fig.25 - Embrião multinucleado.

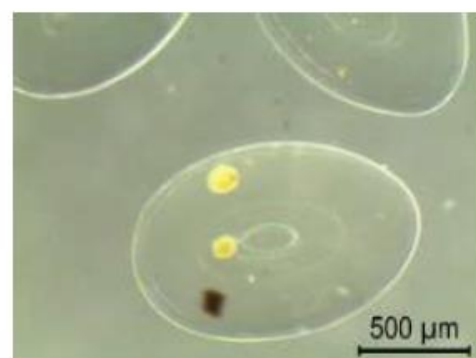


Fig.26 - Dois embriões no mesmo ovo (fase Mórula).

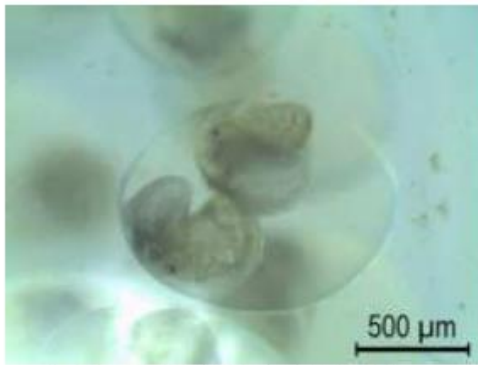


Fig.27 - Dois embriões no mesmo ovo
(fase Hippo).

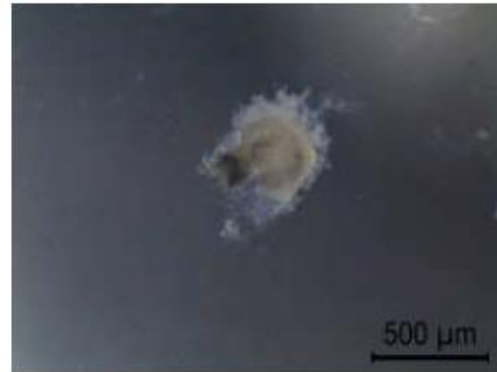


Fig.28 - Embrião que morreu devido ao
aparecimento de fungos.